

LAWYERS' AND MERCHANTS' TRANSLATION BUREAU, INC.
Legal, Financial, Scientific, Technical and Patent Translations
11 BROADWAY
NEW YORK, NY 10004

#30
gnd



Certificate of Accuracy

TRANSLATION

From German into English

German Patent Application

No. 198 21 060.4

STATE OF NEW YORK }
COUNTY OF NEW YORK } s.s.:

On this day personally appeared before me
who, after being duly sworn, deposes and states: Elisabeth A. Lucas

That he is a translator of the German and English languages by profession and
as such connected with the **LAWYERS' & MERCHANTS' TRANSLATION
BUREAU;**

That he is thoroughly conversant with these languages;

That he has carefully made the attached translation from the original document
written in the German language; and

That the attached translation is a true and correct English version of such original,
to the best of his knowledge and belief.

**SUBSCRIBED AND SWORN TO BEFORE ME
THIS**

SEP 18 2002

Susan Tapley
Susan Tapley
Notary Public, State of New York
No. 01TA4999804
Qualified in Queens County
Certificate filed in New York County
and Kings County
Commission Expires July 27, 2005

Elisabeth A. Lucas

Best Available Copy

19 **FEDERAL REPUBLIC
OF GERMANY**

[crest]

**GERMAN PATENT
AND TRADEMARK
OFFICE**

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 21 060 A 1**

51 Int. Cl.⁶:

C 07 K 16/00
A 61 K 48/00
C 07 K 14/435
A 61 K 38/17
C 12 N 15/11
C 07 H 21/04
C 12 N 15/63
C 12 N 1/00
C 12 N 5/10
C 12 P 21/08
C 12 N 5/12
A 61 K 39/395

21 File reference 198 21 060.4
22 Date of filing 11. 5.98
43 Date laid open 15. 4.99

//C12Q 1/68,G01N 33/577

68 Internal priority: 197 41 929.1 23.09.97	72 Inventor: Kroczeck, Richard, Prof. Dr., 13353 Berlin, DE
71 Applicant: Federal Republic of Germany, ultimately represented by the Director of the Robert Koch Institut, 13353 Berlin, DE	
74 Representative: Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman Vossius, Dr. Holger Adam, Dr. Martin Grund, 81679 Munich	

The following details have been taken from the documents submitted by the Applicant

54 **Costimulating polypeptide of T cells, monoclonal antibodies, and the preparation and use thereof**

57 The invention relates to a polypeptide (8F4 molecule) having the biological activity of costimulating T cells. The invention further relates to monoclonal antibodies against the 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies. The invention additionally relates to the use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide 8F4 according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved. The invention additionally relates to the use of the 8F4 molecule or of cells which contain the 8F4 molecule as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved. The invention further relates to the use of substances which specifically recognize the polypeptide according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for the diagnosis of disorders in which the immune system is involved.

Description

The invention relates to a polypeptide (8F4 molecule) having the biological activity of costimulating T cells. The invention further relates to monoclonal antibodies against the 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies. The invention additionally relates to the use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide 8F4 according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, as pharmaceuticals. In particular, the invention relates to the use of these substances for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment of autoimmune diseases and for the prevention of rejection reactions with organ transplants. The invention additionally relates to the use of the 8F4 molecule or of cells which contain the 8F4 molecule as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment of cancers, Aids, asthmatic disorders or chronic viral diseases such as HCV or HBV infections. The invention further relates to the use of substances which specifically recognize the polypeptide according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for the diagnosis of disorders in

which the immune system is involved. In particular, the invention relates to diagnosis by means of an ELISA detection, a flow cytometry or a Western blot, a radioimmunological detection, a nephelometry or a histochemical staining.

T lymphocytes recognize their antigen, which is presented by "antigen-presenting cells", for example dendritic cells, B cells and macrophages, through their T-cell receptor. Recognition of the antigen by the T-cell receptor alone is, however, in most cases insufficient for adequate activation of T lymphocytes. The latter makes additional simultaneous stimulation (also called "costimulation" hereinafter) by other receptor molecules on the surface of the T lymphocytes necessary. One of these receptor molecules is the so-called CD28 receptor which is stimulated by the costimulating molecule B7. If these "costimulatory" molecules, for example CD28, are effective, then the activation of the T cell reaches an adequate level after recognition of the antigen by the T-cell receptor. After such a complete activation, the T cell expresses additional molecules, for example CD25, CD69, CD71, on the surface and synthesizes numerous cytokines, for example IL-2 and IFN- γ , which function as messengers. Both these additional surface molecules and the cytokines serve for the T cell to exchange information with other cells in the immune system. The activated T cells direct the entire

antigen-specific immune defenses through the additional surface molecules and the cytokines. Both the generation of cytotoxic cells ("killer cells") and the generation of antigen-specific antibodies by B cells is controlled in this way. Cytotoxic cells, as well as the specifically formed antibodies, eliminate viral or bacterial pathogens which enter the body. In some cases, however, the immune response goes too far, and the immune system is directed against the body's own cells. This leads to the occurrence of "autoimmune diseases", for example to rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, Sjögren's syndrome, ulcerative colitis inter alia. One of the essential sites of cooperation between antigen-activated T cells and other cells of the immune system are the secondary lymphatic organs, including the tonsils. This is where the T lymphocytes are activated by the antigen presented by dendritic cells, and this is where T lymphocytes interact with B cells. Through this interaction, B cells secrete, after several intermediate stages of differentiation, antigen-specific antibodies of the IgM and IgG types.

The costimulatory molecule which has been characterized best and is among the most effective to date is the CD28 surface molecule (called CD28 receptor or CD28 hereinafter) which is constitutively expressed on a large fraction of T cells. Costimulation by CD28 in vitro leads, after recognition of the antigen by the T-cell receptor, to

a very large increase in cytokine secretion, for example of IL-2 and IFN- γ , and to a marked up-regulation of the expression of cell surface molecules such as CD25, CD69, CD71, which are necessary for interaction of T cells with other immune cells, for example B lymphocytes; cf. Chambers and Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404. Costimulation via the CD28 receptor can also markedly increase the proliferation of T lymphocytes.

In addition, costimulation via the CD28 receptor optimizes the T-cell control of B-lymphocyte function so that there is increased secretion of antibodies. If the function of the CD28 receptor is abolished, there is a drastic loss of function in the immune defenses. This has been shown by means of a transgenic mouse in which the CD28 gene was destroyed by homologous recombination (a so-called "CD28 knock-out"). The destruction in this way of activation of the antigen-specific T cells leads to lack of costimulation. This in turn leads to a disturbance of T-cell function, that is to say to a reduced proliferation of T cells and to a drastically reduced synthesis of various cytokines. The lack of costimulation eventually leads to a reduced function of the antigen-specific immune defenses. Thus, inter alia, the formation of antigen-specific IgG1 and IgG2 antibodies by B lymphocytes is reduced to 10% of the normal level through the lack of CD28; cf. Shahinian et al., *Science* 262 (1993), 609-612; Lucas et al. *Journal of*

Immunology 154 (1995), 5757-5768. It is also possible *in vitro* to prevent the Aids virus entering T lymphocytes by costimulation by CD28; cf. Riley et al., *Journal of Immunology* 158 (1997), 5545-5553. Corresponding experiments *in vivo* have not yet been carried out. It is known that CD28 switches on many cytokine genes which may lead to considerable side effects *in vivo*. Blockade of CD28 receptors by a soluble CTLA-4 immunoglobulin molecule has been employed successfully in a monkey model to prevent the rejection of transplanted kidneys. In this case, CTLA-4 had been employed in combination with an antibody against the CD40 ligand molecule; cf. Kirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8789-8794. However, blockade of CD28 receptors affects all T lymphocytes and not just those already activated because CD28 is constitutively expressed on T lymphocytes.

There is thus a need for a costimulating surface molecule which is expressed only on activated T lymphocytes. The invention is therefore based on the object of providing a surface molecule on activated T cells which has a strong costimulatory effect on central functions of T lymphocytes. Another object of the invention is to provide substances, for example monoclonal antibodies against the costimulatory surface molecule, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists of the surface molecule.

In a first embodiment, the invention relates to a polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells, characterized in that a) the polypeptide occurs on activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes but not on resting or activated B cells, granulocytes, monocytes, NK cells (natural killer cells) or dendritic cells, and b) the polypeptide is a dimer, the polypeptide having a molecular weight of about 55 to 60 kDa (kilodalton) determined in a non-reducing sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the two polypeptide chains of the polypeptide having a molecular weight of about 27 kDa and about 29 kDa measured in a reducing SDS-PAGE.

The polypeptide according to the invention (also called 8F4 molecule or 8F4 hereinafter) is expressed only after activation of the T lymphocytes, specifically both on CD4⁺ and on CD8⁺ T cells. In a non-reducing SDS-PAGE, the 8F4 molecule has a molecular weight between about 55 and 60 kDa (kilodalton). The 8F4 molecule is composed of two peptide chains, and the two peptide chains have a molecular weight of about 27 and about 29 kDa in a reducing SDS-PAGE. The 8F4 antigen can be unambiguously detected histologically on activated T lymphocytes in the lymphatic tissue of the tonsils and lymph nodes, especially in the germinal centers, the site of interaction of T lymphocytes and B lymphocytes in the generation of antibodies. Tonsillar T cells isolated *ex vivo* are about 50-80% positive for the 8F4 antigen and

show signs of advanced activation. The 8F4 molecule is not detectable on resting or activated B cells, granulocytes, monocytes, NK cells and dendritic cells.

An important biological activity of the 8F4 molecule is its costimulating activity on T lymphocytes. The costimulating activity can be determined by the method of Linsley et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. The costimulating activity of the 8F4 molecule resembles the costimulating activity of the CD28 molecule, which has been identified as the central enhancement element of antigen recognition by the immune system. The 8F4 molecule differs in many aspects from CD28, however. Thus, expression of the 8F4 molecule on the surface of the T cells requires induction, whereas CD28 is constitutively expressed. There are also distinct differences detectable in the function: costimulation by CD28 leads to overexpression of numerous lymphokines, inter alia of interleukin-2 (IL-2). Costimulation by 8F4 also leads to enhanced secretion of lymphokines, but not of IL-2. The costimulatory activity of the 8F4 molecule thus differs from the activity of the CD28 molecule. Since stimulation by 8F4 does not switch on all cytokine genes, costimulation by 8F4 in vivo is advantageous, for example compared with costimulation via the CD28 receptor. Moreover, the induction, the expression, the site of expression and the function of the 8F4 molecule

differ from all other known molecules with costimulatory activity.

The 8F4 molecule according to the invention is a novel surface molecule on activated T cells which has a strong costimulatory effect on central functions of T lymphocytes. Expression *in vivo* indicates inter alia an essential involvement of the 8F4 molecule in the cooperation of T cells with other cells of the immune system such as B cells or dendritic cells within the humoral and cellular immune defenses against viruses and bacteria.

After expression, the 8F4 molecule has *in vitro* a strong costimulatory effect on various functions of T lymphocytes:

1. Marked enhancement of the proliferation of T lymphocytes.
2. Marked enhancement of the synthesis of certain cytokines by T lymphocytes.
3. Greatly increased expression of control molecules, for example surface molecules and cytokines, on and in T lymphocytes.
4. Marked improvement in T-cell-induced antibody formation (IgM and IgG) by B cells.

The present invention furthermore provides a polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells and having an amino acid sequence which shows at least 40% homology with the sequence comprising 199 amino

acids in Fig. 15 (SEQ ID NO:2), or a biologically active fragment or an analogue thereof. A biologically active fragment or analogue is a fragment or analogue which likewise shows a costimulatory effect on T-cell lymphocytes or at least displays a biological effect of the nature of a blockage. Preference is given to a polypeptide or a biologically active fragment or analogue thereof which shows at least 60% homology with the sequence comprising 199 amino acids in Fig. 15 (SEQ ID NO:2). In a particularly preferred embodiment, the polypeptide according to the invention comprises an amino acid sequence which shows at least 80% homology with the sequence comprising 199 amino acids in Fig. 15 (SEQ ID NO:2), or a biologically active fragment or analogue thereof.

A particularly preferred polypeptide has the biological activity of costimulation of T cells and comprises an amino acid sequence as shown in Fig. 15 (SEQ ID NO:2), or a biologically active fragment or an analogue thereof.

The invention includes allelic variants, fragments and analogues of the 8F4 molecule. These variants include naturally occurring allelic variants, substitution analogues in which one or more amino acids have been substituted by different amino acids, substitution analogues in which one or more amino acids have been substituted by different amino acids, deletion analogues in which one or more amino acids

have been deleted and addition analogues in which one or more amino acids have been added. Deletion and addition of one or more amino acids may be done either at an internal region of the polypeptide or at the amino or carboxyl terminus.

Polypeptides according to the invention fused to heterologous polypeptides are likewise embraced.

In another embodiment, the invention relates to DNA sequences which encode a polypeptide according to the invention or a biologically active fragment or analogue thereof.

These DNA sequences include the sequence shown in SEQ ID NO:1 (Fig. 16) as well as allelic variants, fragments, and analogues having biological activity.

A preferred DNA sequence encodes a polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells, the sequence being selected from the group consisting of:

a) the DNA sequence shown in SEQ ID NO:1 (Fig. 16) and its complementary strand

b) DNA sequence hybridizing with the sequences in (a) and

c) DNA sequences which, because of the degeneracy of the genetic code, hybridize with the sequences in (a) and (b).

The aforementioned DNA sequences preferably hybridize together under stringent conditions.

Also provided are vectors which comprise these DNA sequences, and host cells which are transformed or transfected with these vectors.

In another embodiment, the invention relates to monoclonal antibodies against the 8F4 molecule. The monoclonal antibodies according to the invention can be prepared in a conventional way by the method described by Milstein and Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-497. In particular, the monoclonal antibodies according to the invention can be prepared by immunizing mice with T cells which have been activated *in vitro* with phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin ("2-signal system") for 24 h. The spleen cells of the immunized mice are fused with myeloma cells. 8F4-specific monoclonal antibodies are identified by their recognition of 2-signal-activated but not resting T lymphocytes. Moreover 8F4-specific antibodies do not stain T cells stimulated with one signal (either PMA or ionomycin) in a detection method carried out in a conventional way. 8F4-specific antibodies produce a typical staining pattern of tonsillar T cells and recognize an antigen of about 55 to 60 kDa in a non-reducing SDS-PAGE and of about 27 kDa and about 29 kDa in a reducing SDS-PAGE on activated T lymphocytes.

In another embodiment, the invention relates to hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies according to the invention.

In another embodiment, the invention relates to the use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide 8F4 according to the invention as pharmaceuticals. The use of the monoclonal antibodies according to the invention, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists of the 8F4 molecule is particularly preferred. These substances can be used as pharmaceuticals for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment or autoimmune diseases or for prevention of rejection reactions in organ transplants. Blockade of the interaction of the 8F4 antigen with its receptor improves, for example, the prevention of organ rejection because such a blockade affects only previously activated T lymphocytes. Another embodiment of the invention relates to the use of the polypeptide according to the invention as pharmaceutical. The polypeptide according to the invention can be used in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved, in particular for the treatment of cancers, AIDS, asthmatic disorders or chronic viral diseases such as HCV or HBV infections.

The polypeptide according to the invention can likewise be introduced into cells in a conventional way so that these cells for example constitutively express the polypeptide. For example, the nucleic acid sequence encoding the polypeptide or a vector comprising the nucleic acid

sequencing encoding the polypeptide, for example the cDNA or genomic DNA, promoters, enhancers and other elements required for expression of the nucleic acid sequence can be inserted into a cell. The 8F4 cDNA (2641 nucleotides) depicted in Fig. 16 (SEQ ID NO:1) or fragments or derivatives thereof, is preferably employed for expression of the polypeptide according to the invention or fragments thereof.

The polypeptide according to the invention can also be introduced for example by means of liposomes into cells which then form the polypeptide on their cell surface. These cells can be used as pharmaceuticals according to the invention, in particular for restoring correct regulation of the human immune system, as occurs within the framework of numerous chronic infectious diseases, for example within the framework of AIDS, asthmatic disorders or in chronic viral hepatitis (for example HCV, HBV), or for stimulating the immune system *in vitro* or *in vivo* such as, for example, be used for the therapy of cancers.

In another embodiment, substances which specifically recognize the polypeptide according to the invention are used for diagnosing disorders in which the immune system is involved, the substances embracing in particular a monoclonal antibody, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists. It is possible to use for the diagnosis for example an ELISA detection, flow cytometry, Western blot,

radioimmunoassay, nephelometry or a histochemical staining. The substances which recognize the polypeptide according to the invention also comprise nucleic acid sequences, the latter preferably being employed for hybridization and/or nucleic acid (RNA, DNA) amplification (for example PCR).

In another embodiment, the polypeptide according to the invention or fragments thereof is expressed by a transgenic animal.

In another embodiment, the invention embraces a transgenic animal in which the gene which codes for the polypeptide according to the invention has been switched off ("knock-out").

The figures serve to illustrate the invention:

Fig. 1 shows the result of an immunoprecipitation of the 8F4 antigen from activated human T cells. (a) Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 12% polyacrylamide gel (PAA gel)) reducing, (b) SDS-PAGE (10% PAA gel) non-reducing. The conditions for elution of the antigen from the 8F4 matrix are indicated. "SDS" means sodium dodecyl sulphate; "DTT" means dithiothreitol, "Mr" means molecular weight and "kDa" means kilodalton.

Fig. 2a shows the result of a flow cytometry after induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells. The activation time for the T cells is indicated in parentheses. "PMA" means phorbol myristate acetate; "PHA" means phytohaemagglutinin; "OKT3" is a monoclonal antibody against

CD3; "MLR" means mixed lymphocyte reaction; "mAK 9.3" is a monoclonal antibody against CD28; "SEB" means staphylococcal enterotoxin B.

Fig. 2b shows the result for the kinetics of induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells after activation with PMA and ionomycin in a flow cytometry. The immunofluorescence (log) is plotted against the cell count.

Fig. 3 shows the result of a flow cytometry for identifying molecules which are involved in the induction of 8F4 in the mixed lymphocyte reaction. "bio" means biotinylated antibody.

Fig. 4 shows the result of a histochemical investigation for localization of 8F4-positive cells in the tonsil.

Fig. 5 shows the result of an expression analysis of 8F4 on T and B cells from human tonsils in a flow cytometry. "bioPE" means biotinylated antibody and streptavidin-phycoerythrin secondary reagent.

Fig. 6 shows the coexpression of the 8F4 molecule with other activation markers (CD69, CD45) in a flow cytometry.

Fig. 7 shows diagrammatically the enhanced expression of activation molecules on T lymphocytes after costimulation by 8F4. Open circles (O) represent 8F4 antibodies; triangles (♦) represent nonspecific antibodies

of the same isotype; filled circles (●) represent anti-CD28 antibodies-9.3.

Fig. 8 shows a diagrammatic comparison of the costimulating effect of 8F4 with the costimulating effect of CD28. "mAk" means monoclonal antibodies; "ATAC" means "activation induced T-cell-derived and chemokine-related"; "cpm" means radioactive disintegrations per minute.

Fig. 9 shows diagrammatically the enhancement of the synthesis of the antibodies of the IgM and IgG types by B cells after costimulation of T cells. "ng" means nanogram; "ml" means milliliter; "mAk" means monoclonal antibody.

Fig. 10 shows diagrammatically the prevention of the activation-induced apoptosis of peripheral T cells after costimulation by 8F4.

Fig. 11 shows expression of the 8F4 antigen on the MOLT-4V cell line. MOLT-4V cells were stained with a fluorescein-labeled 8F4 antibody (8F4-FITC) and investigated in flow cytometry (unfilled line, comparing with an isotype control (filled line)).

Fig. 12 shows the two-dimensional gel electrophoresis. A MOLT-4V cell lysate from 300×10^6 cells was immunoprecipitated as described. The eluate was fractionated on a non-reducing SDS-PAGE (10% PAA), and the region around 60 kDa was cut out of the gel. To reduce the disulphide bridges in the 8F4 molecule, the piece of gel was incubated in 5.3 M urea, 0.5 M Tris, pH 8.0, 1% SDS, 1% β -

mercaptoethanol at 50°C for 1 h, and the free cysteine residues in the molecule were alkylated with 10 mM iodoacetamide (Sigma, Deisenhofen) (37°C, 30 min). The piece of gel was equilibrated in 1xSDS-PAGE sample buffer for a further 30 min and mounted on a 12% PAA-SDS gel (with stacking gel). After fractionation by electrophoresis, the gel underwent silver staining. The location of the 8F4 protein was determined by surface iodination (cf. Fig. 1) and is marked by a circle. (All the procedures not described in detail were carried out by standard methods, see, for example, Westermeier, R., Electrophoresis in Practice, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997).

Fig. 13 shows a hybridization with Oligo 1 (SEQ ID NO:3). Lambda clones immobilized on nitrocellulose filters were hybridized with Oligo 1 as described in the examples. Exposure on an X-ray film is depicted (detail).

Fig. 14 shows a Northern blot analysis with the 8F4 cDNA. Hybridization of a Northern blot with the 8F4 cDNA produces a band which migrates in the gel between the 18S and 28S RNA. Fig. 14A shows the behavior as 2-signal-dependent (see above) activation antigen: no expression in resting lymphoid cells (PBL), strong expression in PMA+ionomycin-activated CD4+ T cells and distinctly reduced expression with PMA or ionomycin alone. Fig. 14B shows the strength of mRNA expression after different stimulation times (T cells (purified via nylon wool adherence, NTC),

stimulated with PMA+ionomycin). Besides this the MOLT-4 cell lines (ATCC CRL-1582) which shows only minimal expression, and on the far right the MOLT-4V which was used for the cloning and which shows a distinct signal. Also loaded is the RNA from other cell lines on which no 8F4 expression was detectable in the analysis by flow cytometry: CEM (ATCC CCL-119), HUT-102 (ATCC TIB-162), HUT-78 (ATCC TIB-161), Jurkat (ATCC TIB-152), DG75 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ACC83), Karpas 299 (Fischer, P. et al. (1988), Blood, 72:234-240), DEL (Barbey, S. et al. (1990), Int. J. Cancer, 45:546-553).

Fig. 15 shows the amino acid sequence of the polypeptide 8F4 (SEQ ID NO:2).

Fig. 16 shows the 8F4 cDNA (SEQ ID NO:1).

The following examples illustrate the invention and are not to be understood restrictively.

Example 1: Generation of the 8F4 antibody

Balb/c mice were immunized with human T cells which had previously been activated for 24 h with 33 ng/ml of the phorbol ester phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma, Deisenhofen) and with 200 ng/ml of the Ca^{2+} ionophore ionomycin (Sigma, Deisenhofen) (so-called "2-signal activation"). After boosting three times, the spleen cells of the mice were fused with the myeloma P3X63Ag8.653 (ATCC No. CRL-1580), and antibody-secreting hybridomas were generated by standard methods; cf. Peters and Baumgarten,

Monoclonal Antibodies, Springer, Heidelberg, 1992. The resulting antibodies were screened for activated versus resting T cells in flow cytometry. Activated ("2-signal activation") and resting T cells were incubated with the hybridoma supernatant and then labeled with a fluorescence-labeled secondary antibody; cf. Shapiro, Practical Flow Cytometry, Wiley-Liss, New York, 1995. Only the antibodies which recognize molecules which were induced exclusively by PMA and the Ca^{2+} ionophore ionomycin on the T-cell surface, but not by one of the agents alone ("2-signal molecules"), were selected for further purification. The resulting antibodies were investigated in flow cytometry for similarity to or difference from known antibodies against activation molecules (cf. Table 1) on T cells. The criteria for this were, besides the above-mentioned "2-signal dependence", the kinetics of induction on stimulated T cells and the expression on various cell lines.

Example 2: Immunoprecipitation of the 8F4 antigen

Surface molecules from activated human T cells were iodinated with ^{125}I by standard methods and immunoprecipitated with the antibody 8F4 by standard methods; cf. Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, Academic Press, London, 1996. The antibody for the immunoprecipitation was coupled by the method of Schneider et al., *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), 10766-10769, to protein G (Pharmacia, Freiburg) (8F4 matrix). The

matrix was washed as described by Schneider et al., see above. The immunoprecipitated 8F4 molecule was analyzed for its molecular mass in an SDS-PAGE (non-reduced and reduced) in a conventional way; Goding, see above.

Example 3: Flow cytometry

The 8F4-carrying T cells were analyzed in flow cytometry by standard methods; cf. Shapiro, Practical Flow Cytometry, Wiley-Liss, New York, 1995.

Exemplary embodiment 3.1: Flow cytometry after induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells.

CD4⁺ T cells from peripheral blood were stimulated with various agents in a conventional way, and investigated for expression of the 8F4 molecule in flow cytometry by a conventional method. The activation time for the T cells was between 24 hours and 144 hours with the various agents. Modes of activation: phorbol myristate acetate (PMA; 33 ng/ml), ionomycin (200 ng/ml), phytohaemagglutinin (PHA 1.5 mg/ml), OKT3 (monoclonal antibody against CD3), mixed lymphocyte reaction (MLR, between 50,000 CD4⁺ T cells and 100,000 B cells), mAk 9.3 (monoclonal antibody against CD28), staphylococcal enterotoxin B (SEB, 0.1 ng/ml). Analysis revealed that various stimuli are suitable for inducing the 8F4 molecule on T cells, but the expression density differs. The most potent stimuli, besides the highly active pharmacological agents PMA and ionomycin, are those

which represent a costimulatory situation such as, for example, accessory cells in the MLR or the costimulating mAk 9.3.

Exemplary embodiment 3.2: Kinetics of induction of the 8F4 antigen on CD4⁺ T cells after activation with PMA and ionomycin.

CD4⁺ T cells from peripheral blood were stimulated with PMA (33 ng/ml) and ionomycin (200 ng/ml) in a conventional way and investigated after 0, 4, 8, 12, 24 and 48 hours for expression of the 8F4 molecule by flow cytometry in a conventional way. The molecule is detectable on the surface after only four hours, and thus belongs to the class of relatively early activation antigens. There is still good expression of the antigen even after 48 hours.

Exemplary embodiment 3.3: Flow cytometry to identify molecules which are involved in the induction of 8F4 in the "mixed lymphocyte reaction".

50,000 CD4⁺ T cells from peripheral blood were cocultivated with 100,000 allogeneic tonsillar B cells for 6 days (37°C, 5.2% CO₂, 200 µl of RPMI 1640 with 10% FCS in 96-well round-bottom plates) and then investigated for expression of the 8F4 molecule in flow cytometry. At the start of cultivation, various antibodies (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCII; all 10 mg/ml) were added to the culture in order to examine the dependence of 8F4 induction on these

molecules. Expression of 8F4 can be blocked only by blockade of the CD86/CD28 interaction, but not by blockade of CD80. The blockade effect in this case is even stronger than the blockade of MHCII (positive control).

Exemplary embodiment 3.4: Expression of 8F4 on T and B cells from human tonsils.

B cells and T cells from tonsillar tissue from various sources were purified in a conventional way and investigated by flow cytometry for expression of the 8F4 molecule. Whereas the signal was not unambiguously significant on B cells, there was expression of the 8F4 molecule in varying density by about 50-80% of tonsillar T cells. It is possible in this case to identify two populations differing in the level of fluorescence (8F4 high and low, respectively), and differing in expression on the various tonsils. Thus, for example, tonsils shows a pronounced 8F4 low population and other tonsils shows a pronounced 8F4 high population.

Exemplary embodiment 3.5: Coexpression of the 8F4 molecule with other activation markers.

T cells purified from human tonsils were analyzed in 2-colour flow cytometry for coexpression of the 8F4 molecule with other activation markers. In tonsils, 8F4 is coexpressed with CD69 as well as with variants of the CD45 molecule. In this case, the 8F4 high cells are unambiguously correlated with a CD45R0 expression, while the 8F4-negative

cells carry the phenotype CD45RA. CD45RA is mainly expressed by so-called "naïve" T cells, whereas CD45RO is associated with an effector cell function. The 8F4⁺ cells are thus mainly "mature" T cells. CD45RO and CD45RA are isoforms of CD45.

Example 4: Localization of 8F4-positive cells in the tonsil

Tonsillar tissue in frozen sections was stained with the 8F4 antibody in the APAAP technique (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase) by standard methods. 8F4⁺ cells were found preferentially in the germinal center of the tonsils, but also in part in the T-cell zone of the tonsils.

Example 5: Costimulation of T lymphocytes

96-well plates were coated with a goat anti-mouse Ig antibody (20 µg/ml), washed, and loaded with the anti-CD3 monoclonal antibody OKT3 (various dilutions of an ascites) and the 8F4 antibody according to the invention (2 µg/ml). The OKM1 antibody or the 2A11 antibody (both 2 µg/ml) were used as isotype control.

Exemplary embodiment 5.1: Enhanced expression of activation molecules on T lymphocytes after costimulation by 8F4.

Purified CD4⁺ T cells from peripheral blood were activated with various concentrations of the monoclonal antibody OKT3 and, at the same time, costimulated with the 8F4 antibody or a nonspecific antibody of the same isotype.

As comparison, costimulation was carried out with the anti-CD28 antibody-9.3, one of the strongest known costimulatory antibodies. Even with optimal stimulation by CD3, a costimulatory effect is still to be seen both with the mAk 8F4 and with the mAk 9.3. In the suboptimal OKT3 region, that is to say the region in which complete T-cell activation cannot be achieved without costimulation, both antibodies are able to increase the expression of other activation antigens by a factor of 4 to 100, and the effect of the anti-CD28 antibody is still visible even at very high OKT3 dilutions. This is attributable to the fact that with very weak OKT3 stimulation the 8F4 antigen is no longer brought to the cell surface and thus cannot be crosslinked by the mAk 8F4 either.

Exemplary embodiment 5.2: Comparison of the costimulating effect of 8F4 with the costimulating effect of CD28.

Purified CD8⁺ T cells were stimulated with a suboptimal concentration of the monoclonal antibody OKT3 for 51 h. The costimulators employed were antibody 8F4, antibody 9.3 (anti-CD28) and isotype controls (2 µg/ml each). After completion of the stimulation time, the T-cell proliferation rate was determined by ³H-thymidine incorporation. In parallel cultures, the supernatant was removed and the concentration of the cytokines ATAC/lymphotactin and IL-2 was determined. 8F4 and CD28 differ greatly from one another in relation to IL-2 synthesis. CD28 costimulation leads, as

also described in the prior art (Chambers and Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404), to very extensive IL-2 secretion. By contrast, IL-2 production with 8F4 is below the detection limit. However, proliferation is comparable in the two mixtures, and thus the autocrine growth of the T cells must be attributed to other factors on costimulation of 8F4. The two antibodies also differ scarcely at all in the costimulatory effect in relation to secretion of the lymphokine ATAC.

Example 6: Determination of the immunoglobulins synthesized by B cells after interaction with 8F4-costimulated T cells

96-well plates were coated with a goat anti-mouse Ig antibody (20 µg/ml), and loaded with the anti-CD3 monoclonal antibody OKT 3 (1:500 to 1:80,000 ascites) and the 8F4 antibody according to the invention (2 µg/ml). The OKM1 antibody or the 2A11 antibody was used as isotype control. In some experiments, a costimulation was carried out with a CD28-specific antibody ("9.3") for comparison; cf. Hara et al., *Journal of Experimental Medicine* 161 (1985), 1513-1524. 50,000 purified (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4⁺ T cells (>95% purity) from peripheral blood and 25,000 allogenic tonsillar B cells (negative selection by T-cell rosetting with sheep erythrocytes, 96% purity) were pipetted into each well of the culture plates pretreated in this way, and cocultivated for 8 days. After this period, the supernatant was removed and analyzed for the concentration of secrete

immunoglobulins of the IgM and IgG types in an ELISA in a conventional way; cf. Nishioka and Lipsky, *Journal of Immunology* 153 (1994), 1027-1036.

Exemplary embodiment 6.1: Enhancement of the synthesis of antibodies of the IgM and IgG types by the B cells after costimulation of T cells.

Purified CD4⁺ T cells from peripheral blood were cocultivated with allogeneic B cells from tonsils for 8 days in a conventional way. With suboptimal stimulation of the T cells with the OKT3 antibody, the costimulation of the T cells by 8F4 enhances the secretion of IgM and IgG immunoglobulins by a factor of 40.

Example 7: Prevention of the activation-induced apoptosis of peripheral T cells after costimulation by 8F4.

Peripheral T cells (purified by nylon wool adherence in a conventional way), were stimulated with PHA (1.5 mg/ml) for 20 h and cultivated with IL-2 for 6 days. The cells were then restimulated by OKT3 with and without costimulation by mAk 8F4 (2 µg/ml). The apoptosis was determined by staining the DNA with propidium iodide in flow cytometry (FACS). With suboptimal stimulation via the T-cell receptor complex, costimulation by 8F4 can reduce the proportion of apoptotic cells by a factor of 4.

Example 8: Cloning of the cDNA coding for the 8F4 protein

A cell line (MOLT-4V) which expresses the 8F4 antigen constitutively was identified in flow cytometry by staining with a fluorescent dye-coupled 8F4 antibody (Fig. 11). The MOLT-4V line is a variant of the human T-cell line MOLT-4 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1582).

This cell line was used for preparative purification of the 8F4 antigen with the aid of the monoclonal antibody:

The cells were cultivated on a large scale (150 l) in roller culture bottles and removed by centrifugation, and the cellular proteins were extracted using a lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen), 1% NP-40 (Boehringer, Mannheim)). Cell nuclei and other insoluble constituents were removed by ultracentrifugation. The cell lysate obtained in this way was preincubated with Sepharose CL4-B (Pharmacia, Freiburg) for 2 h in order to remove proteins which bind nonspecifically to Sepharose. Incubation then took place with the 8F4 immunoaffinity matrix described in Example 2 above (4 h at 4°C). The matrix was packed into a column and then washed several times under conditions with which there is exclusive removal of nonspecifically binding proteins (1.50 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.5% NP-40; 2.50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.5% NP-40, 0.1% SDS; 3. 0.2 M glycine pH 4.0,

0.5% CHAPS (Merck, Darmstadt)). The 8F4 antigen was eluted from the matrix with 0.2 M glycine, pH 2.5, 0.5% CHAPS. The eluate was concentrated by ultrafiltration (Amicon Centricon 10, Millipore, Eschborn).

In order to achieve further purification of the 8F4 molecule, the dimeric structure of the molecule (see Fig. 1) was utilized in a two-dimensional gel electrophoresis (nonreducing/reducing): since most proteins occur as monomer, they migrate on a diagonal in gel electrophoresis, whereas the 8F4 molecule migrates at 55-60 kDa in the 1st dimension (nonreducing) and at 27 and 29 kDa (Fig. 12) in the 2nd dimension (reducing).

For preparative fractionation, the immunoprecipitates from in each case 20×10^9 cells were prepared as described above for Fig. 12 and fractionated in two-dimensional gel electrophoresis, the gel was stained with Coomassie blue G250 (Biorad, Munich) and the areas indicated in Fig. 12 were separately cut out of the gel (8F4-27 kDa and 8F4-29 kDa respectively).

For peptide microsequencing, the proteins from in each case 4 pieces of gel were digested with trypsin and eluted from the gel. The tryptic fragments were fractionated by HPLC and individual fractions were subjected to Edman degradation (method described in detail in Groettrup, M. et al. (1996), Eur. J. Immunol., 26:863-869).

Sequencing of the 8F4-29 kDa sample revealed, besides fragments of known proteins, a peptide sequence XRLTDVT for which no human correlate was found in any of the protein databases.

Unambiguous translation back of a protein sequence into a DNA sequence is not possible. Thus, translation of the above peptide sequence back into an oligonucleotide with 17 nucleotides results in 2048 permutations. However, a specific method (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182:738-751) makes it possible to screen a cDNA bank with degenerate oligonucleotides. On the basis of the peptide sequence found, 2 oligonucleotides (Oligo 1 (SEQ ID NO:3); MGN CTS ACN GAY GTN AC, 512 permutations; Oligo 2 (SEQ ID NO:4): MGN YTD ACN GAY GTN AC, 1024 permutations) were synthesized.

For screening, a cDNA bank was constructed from the MOLT-4V cell line also used for the protein purification:

Complete RNA was isolated by the guanidinium/CsCl method (Chirgwin, J.M. et al. (1979), Biochemistry 18:5294-5299), and mRNA was concentrated on Oligo-dT-cellulose columns (Gibco BRL, Eggenstein). Synthesis of the first and second cDNA strands was carried out using a commercial cDNA synthesis system (Gibco BRL, Eggenstein) using Oligo-dT primers in accordance with the manufacturer's instructions.

The cDNA was ligated via EcoRI adaptors into the Lambda ZAPII vector (Stratagene, Heidelberg).

The cDNA bank was plated out by standard methods (Vogeli, G. and Kaytes, P.S. (1987), *Methods Enzymol.*, 152:407-515) and the Lambda DNA was immobilized on nitrocellulose filters (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell, Dassel).

The above-mentioned oligonucleotides were radiolabeled using T4 polynucleotide kinase (NEBL, Schwalbach) and γ -³²P ATP (NEN Du Pont, Brussels) (Wallace, R.B. and Miyada, C.G. (1987), *Methods Enzymol.*, 152:432-442).

Hybridization of the filters took place in a buffer described for degenerate oligonucleotides (Wozney, J.M. (1990), *Methods Enzymol.* 182:738-751) with 3 M tetramethylammonium chloride (Roth, Karlsruhe) at 48°C. The filters were washed as described in the above-mentioned reference, the washing temperature being 50°C. Exposure of these filters on an X-ray film revealed about 50 positive clones per 100,000 plated phages (Fig. 13).

6 clones were further characterized by transferring them by in vivo excision, using the method described by the manufacturer of the vector (Stratagene, Heidelberg), into a plasmid vector, and partially sequencing with T3 and T7 primers (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied

Biosystems, Foster City, USA). One of the clones contained a sequence which on translation provided exactly the peptide sequence which was sought. This clone was used for hybridization of a Northern blot (Fig. 14) (KroczeK, R.A. (1993), J. Chromatogr., 618, 133-145). The expression pattern of the mRNA corresponded exactly to the expression of the 8F4 molecule as was known from investigations on the monoclonal antibody by flow cytometry. Since the clone which was found contained only the 3' end of the cDNA sought, a fragment on the 5' side was used to isolate the complete 8F4 cDNA. Several clones were sequenced on both strands.

The 8F4 cDNA (2641 nucleotides) is depicted in Fig. 16 and in the sequence listing under SEQ ID NO:1, and codes for a protein having 199 amino acids (Nucleotides 68-664), depicted in Fig. 15 and in the sequence listing under SEQ ID NO:2. Sequencing of several independent clones from the cDNA bank showed some deviations from the sequence shown here, but these are all in the 3'-untranslated region:

Pos. 909-910:deletion

Pos. 1631:T->C

Pos. 2074:G->T

Pos. 2440:G->C

Pos. 2633: alternative polyadenylation site

Table 1:

Table 1 summarizes the antibodies used (clone), their source of origin (source), the specificity for their particular antigen (specificity) and, where appropriate, their labeling (label).

Specificity	Label	Isotype	Clone	Source
CD3	Cy-Chrome	IgG1	UCHT1	Pharmingen, Hamburg
CD3	-	IgG2a	OKT3	ATCC CRL-8001
CD11b	-	IgG2b	OKM1	ATCC CRL-8026
CD25	FITC	IgG2a	B1.49.9	Immunotech, Hamburg
CD28	-	IgG2a	9.3	Immunex Corp., Seattle
CD45RA	Cy-Chrome	IgG2b	HI100	Pharmingen, Hamburg
CD45RO	FITC	IgG2a	UCHL1	Immunotech, Hamburg
CD69	FITC	IgG1	FN50	Pharmingen, Hamburg
CD80	-	IgG1	L307.4	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	-	IgG2b	IT2.2	Pharmingen, Hamburg
CD154	FITC	IgG1	TRAP-1	Hybridoma ¹
MHCII	-	IgG2a	L243	ATCC HB-55
8F4	-	IgG1	8F4	Hybridoma ¹
8F4	Biotin	IgG1	8F4	Hybridoma ¹
Isotype IgG1	-	IgG1	2A11	Hybridoma ^{1,2}
Isotype IgG1	FITC	IgG1	2A11	Hybridoma ^{1,2}
Isotype	Biotin	IgG1	ASA-1	Hybridoma ¹

IgG1				
------	--	--	--	--

¹ The hybridoma cell line was generated in a conventional way, and the antibody was purified and labeled where appropriate.

² Directed against a synthetic peptide

The antisera and secondary reagents used in the examples were purchased from: goat anti-mouse Ig, FITC conjugated, from Jackson Immuno Research Lab., USA; Streptavidin, PE-conjugated, from Jackson Immuno Research Lab., USA; rabbit anti-mouse Ig fraction, from Sigma, Deisenhofen.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: Federal Republic of Germany, ultimately
represented by the Director of the Robert-
Koch-Institut

(B) STREET: Nordufer 20

(C) CITY: Berlin

(D) STATE OR
PROVINCE: Berlin

(E) COUNTRY: Germany

(F) POSTAL CODE: 13353

(ii) TITLE OF INVENTION: Costimulating polypeptide of T cells,
monoclonal antibodies, and the preparation and use thereof

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) COMPUTER-READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 2641 base pairs

(B) TYPE: Nucleotides

(C) STRANDEDNESS: Double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

CGAGAGCCTG AATTCAGTGT CAGCTTTGAA CACTGAACGC GAGGACTGTT AACTGTTTCT	60
GGCAAACATG AAGTCAGGCC TCTGGTATTT CTTTCTCTTC TGCTTGCACA TTAAAGTTTT	120
AACAGGAGAA ATCAATGGTT CTGCCAATTA TGAGATGTTT ATATTTACA ACAGGAGGTGT	180
ACAAATTTTA TGCAAATATC CTGACATTGT CCAGCAATTT AAAATGCAGT TGCTGAAAGG	240
GGGGCAAATA CTCTGCGATC TCACTAAGAC AAAAGGAAGT GGAAACACAG TGTCCATTAA	300
GAGTCTGAAA TTCTGCCATT CTCAGTTATC CAACAACAGT GTCTCTTTTT TTCTATACAA	360
CTTGGACCAT TCTCATGCCA ACTATTACTT CTGCAACCTA TCAATTTTGT ATCCTCCTCC	420
TTTTAAAGTA ACTCTTACAG GAGGATATTT GCATATTTAT GAATCACAAC TTTGTTGCCA	480
GCTGAAGTTC TGGTTACCCA TAGGATGTGC AGCCTTTGTT GTAGTCTGCA TTTGGGATG	540
CATACTTATT TGTTGGCTTA CAAAAAGAA GTATTCATCC AGTGTGCACG ACCCTAACGG	600

TGAATACATG TTCATGAGAG CAGTGAACAC AGCCAAAAAA TCTAGACTCA CAGATGTGAC	660
CCTATAATAT GGAAGTCTGG CACCCAGGCA TGAAGCACGT TGGCCAGTTT TCCTCAACTT	720
GAAGTGCAAG ATTCTCTTAT TTCCGGGACC ACGGAGAGTC TGACTTAACT ACATACATCT	780
TCTGCTGGTG TTTTGTTCAT TCTGGAAGAA TGACTGTATC AGTCAATGGG GATTTTAACA	840
GACTGCCTTG GTACTGCCGA GTCCTCTCAA AACAAACACC CTCTTGCAAC CAGCTTTGGA	900
GAAAGCCAG CTCCTGTGTG CTCCTGCGGA GTGGAATCCC TGTCTCCACA TCTGCTCCTA	960
GCAGTGCAATC AGCCAGTAAA ACAAACACAT TTACAAGAAA AATGTTTTAA AGATGCCAGG	1020
GGTACTGAAT CTGCAAAGCA AATGAGCAGC CAAGGACCAG CATCTGTCCG CATTTCACTA	1080
TCATACTACC TCTTCTTTCT GTAGGGATGA GAATTCCTCT TTTAATCAGT CAAGGGAGAT	1140
GCTTCAAAGC TGGAGCTATT TTATTTCTGA GATGTTGATG TGAAGTGTAC ATTAGTACAT	1200
ACTCAGTACT CTCCTTCAAT TGCTGAACCC CAGTTGACCA TTTTACCAAG ACTTTAGATG	1260
CTTCTTGTG CCCTCAATTT TCTTTTAAAT AATACTTCTA CATGACTGCT TGACAGCCCA	1320
ACAGCCACTC TCAATAGAGA GCTATGTCTT ACATTCTTTC CTCTGCTGCT CAATAGTTTT	1380
ATATATCTAT GCATACATAT ATACACACAT ATGTATATAA AATTCATAAT GAATATATTT	1440
GCCTATATTC TCCCTACAAG AATATTTTTG TCCCAGAAAG ACATGTTCTT TTCTCAAATT	1500
CAGTTAAAT GGTTTACTTT GTTCAAGTTA GTGGTAGGAA ACATTGCCCC GAATTGAAAG	1560
CAAATTTATT TTATATCCT ATTTTCTACC ATTATCTATG TTTTCATGGT GCTATTAATT	1620
ACAAGTTTAG TTCTTTTGT AGATCATATT AAAATTGCAA ACAAATCAT CTTTAATGGG	1680
CCAGCATTCT CATGGGGTAG AGCAGAATAT TCATTTAGCC TGAAAGCTGC AGTTACTATA	1740
GGTTGCTGTC AGACTATACC CATGGTGCCT CTGGGCTTGA CAGGTCAAAA TGGTCCCCAT	1800
CAGCCTGGAG CAGCCCTCCA GACCTGGGTG GAATTCAGG GTTGAGAGAC TCCCCTGAGC	1860
CAGAGGCCAC TAGGTATTCT TGCTCCAGA GGCTGAAGTC ACCCTGGGAA TCACAGTGGT	1920
CTACCTGCAT TCATAATTCC AGGATCTGTG AAGAGCACAT ATGTGTCAGG GCACAATTCC	1980
CTCTCATAAA AACCACACAG CCTGGAAATT GGCCCTGGCC CTTCAAGATA GCCTTCTTTA	2040
GAATATGATT TGGCTAGAAA GATTCTTAAA TATGTGGAAT ATGATTATTC TTAGCTGGAA	2100
TATTTTCTCT ACTTCCTGTC TGCATGCCCC AGGCTTCTGA AGCAGCCAAT GTCGATGCAA	2160
CAACATTTGT AACTTTAGGT AACTGGGAT TATGTTGTAG TTTAACATTT TGTAAGTGTG	2220
TGCTTATAGT TTACAAGTGA GACCCGATAT GTCATTATGC ATACTTATAT TATCTTAAGC	2280
ATGTGTAATG CTGGATGTGT ACAGTACAGT ACTGAACTTG TAATTTGAAT CTAGTATGGT	2340
GTTCTGTTTT CAGCTGACTT GGACAACCTG ACTGGCTTTG CACAGGTGTT CCCTGAGTTG	2400
TTTGACAGTT TCTGTGTGTG GGGTGGGGTA TGGGGAGGAG AACCTTCATG GTGGCCACC	2460
TGGCCTGGTT GTCCAAGCTG TGCCTCGACA CATCCTCATC CCCAGCATGG GACACCTCAA	2520

GATGAATAAT AATTCACAAA ATTTCTGTGA AATCAAATCC AGTTTAAAGA GGAGCCACTT	2580
ATCAAAGAGA TTTTAACAGT AGTAAGAAGG CAAAGAATAA ACATTGATA TTCAGCAACT	2640
G	2641

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 199 amino acids
- (B) TYPE: Amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

[illegible]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 17 base pairs

(B) TYPE: Nucleotides

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(iii) HYPOTHETICAL: Yes

(iv) ANTISENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

MGNCTSACNG AYG TNAC

17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 17 base pairs

(B) TYPE: Nucleotides

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(iii) HYPOTHETICAL: Yes

(iv) ANTISENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

MGNYTDACNG AYG TNAC

17

Patent claims

1. A polypeptide

a) having the biological activity of costimulation of T cells,

b) which occurs on activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes but not on resting or activated B cells, granulocytes, monocytes, NK cells or dendritic cells, and

c) which is a dimer, the polypeptide having a molecular weight of about 55 to 60 kDa determined in a nonreducing SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and the two polypeptide chains of the polypeptide having a molecular weight of about 27 kDa and about 29 kDa measured in a reducing SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

2. A polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells and having an amino acid sequence which shows at least 40% homology with the sequence comprising 199 amino acid [sic] in Fig. 15 (SEQ ID NO:2), or a biologically active fragment or an analogue thereof.

3. The polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells according to Claim 2 and comprising the amino acid sequence shown in Fig. 15 (SEQ ID NO:2), or a biologically active fragment or an analogue thereof.

4. A DNA sequence which encodes a polypeptide according to any of Claims 1 to 3 or a fragment thereof.

5. DNA sequence encoding a polypeptide having the biological activity of costimulation of T cells, the sequence being selected from the group consisting of:

a) the DNA sequence shown in SEQ ID NO:1 (Fig. 16) and its complementary strand

b) DNA sequence hybridizing with the sequences in (a) and

c) DNA sequences which, because of the degeneracy of the genetic code, hybridize with the sequences in (a) and (b).

6. A plasmid or a viral DNA vector comprising a DNA sequence according to Claim 4 or 5.

7. A prokaryotic or eukaryotic host cell stably transformed or transfected with a plasmid or DNA vector according to Claim 6.

8. Method for preparing a polypeptide according to any of Claims 1-3, comprising the cultivation of the host cell according to Claim 7 for expression of the polypeptide in the host cell.

9. An antibody which binds the polypeptide according to any of Claims 1-3.

10. An antibody according to Claim 9, which is a monoclonal antibody.

11. Monoclonal antibody which specifically recognizes the polypeptide according to any of Claims 1-3, characterized in that B cells of mice which are immunized with human T lymphocytes activated [lacuna] PMA and the Ca^{2+} ionophores ionomycin are fused with a myeloma cell line to give an antibody-secreting hybridoma, and the monoclonal antibodies are purified in flow cytometry for 2-signal molecule-activated against resting T cells..

12. Hybridoma cell which generates the monoclonal antibody according to Claim 10 or 11.

13. Use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide according to any of Claims 1-3 as pharmaceuticals.

14. Use according to Claim 13, where the substances comprise a monoclonal antibody, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists.

15. Use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide according to any of Claims 1-3 for the production of a pharmaceutical for the treatment of autoimmune diseases, for the prevention of rejection reactions in organ transplants and for the treatment of dysregulation of the immune system.

16. Use of the polypeptide according to any of Claims 1-3 as pharmaceutical.

17. Use of the polypeptide according to any of Claims 1-3 for the production of pharmaceuticals for the treatment of cancers, Aids, asthmatic disorders or chronic viral diseases such as HCV or HBV infections.

18. Use of cells comprising the polypeptide according to any of Claims 1-3 as pharmaceuticals.

19. Use of cells according to Claim 18 for the production of a pharmaceutical for the treatment of cancers, Aids, asthmatic disorders or chronic viral diseases such as HCV or HBV infections.

20. Use of substances which specifically recognize the polypeptide according to any of Claims 1-3 for the diagnosis of disorders in which the immune system is involved.

21. Use according to Claim 20, where the substances comprise nucleic acid (RNA, DNA) molecules.

22. Use according to Claim 21, where a hybridization or nucleic acid application technique (for example PCR) is used for the diagnosis.

23. Use according to Claim 20, where the substances comprise a monoclonal antibody, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists.

24. Use according to Claim 20 or 21, where an ELISA detection, flow cytometry, Western blot, radioimmunoassay,

nephelometry or a histochemical staining is used for the diagnosis.

Abstract

The invention relates to a polypeptide (8F4 molecule) having the biological activity of costimulating T cells. The invention further relates to monoclonal antibodies against the 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies. The invention additionally relates to the use of substances which inhibit the biological activity of the polypeptide 8F4 according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved. The invention additionally relates to the use of the 8F4 molecule or of cells which contain the 8F4 molecule as pharmaceuticals, in particular for the prevention or therapy of disorders in which the immune system is involved. The invention further relates to the use of substances which specifically recognize the polypeptide according to the invention, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for the diagnosis of disorders in which the immune system is involved.

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 21 060 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 21 060.4
㉑ Anmeldetag: 11. 5. 98
㉒ Offenlegungstag: 15. 4. 99

⑤ Int. Cl. 6:
C 07 K 16/00
A 61 K 48/00
C 07 K 14/435
A 61 K 38/17
C 12 N 15/11
C 07 H 21/04
C 12 N 15/63
C 12 N 1/00
C 12 N 5/10
C 12 P 21/08
C 12 N 5/12
A 61 K 39/395

DE 198 21 060 A 1

A
14
pp

// C12Q 1/68, G01N 33/577

⑥ Innere Priorität:
197 41 929. 1

23. 09. 97

⑦ Anmelder:
Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch
den Direktor des Robert Koch Instituts, 13353
Berlin, DE

⑧ Vertreter:
Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman
Vossius, Dr. Holger Adam, Dr. Martin Grund, 81679
München

⑫ Erfinder:
Kroczeck, Richard, Prof. Dr., 13353 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤ Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

⑦ Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

DE 198 21 060 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Substanzen zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Diagnose mittels eines ELISA-Nachweises, einer Durchflußzytometrie, eines Western Blot, eines Radioimmunnachweises, einer Nephelometrie oder einer histochemischen Anfärbung.

T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen, das von "Antigen-präsentierenden Zellen", z. B. dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, dargeboten wird, durch ihren T-Zell-Rezeptor. Die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor alleine aber reicht in den meisten Fällen nicht aus, um T-Lymphozyten ausreichend zu aktivieren. Hierzu bedarf es der zusätzlichen, gleichzeitigen Stimulation (nachfolgend auch "Ko-Stimulation" genannt) durch andere Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Eines dieser Rezeptormoleküle ist der sogenannte CD28-Rezeptor, der durch das ko-stimulierende Molekül B7 stimuliert wird. Werden diese "ko-stimulatorischen" Moleküle, z. B. CD28, wirksam, so erreicht die Aktivierung der T-Zellen nach der Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor ein ausreichendes Niveau. Nach einer solchen vollständigen Aktivierung exprimiert die T-Zelle zusätzliche Moleküle, z. B. CD25, CD69, CD71, auf der Oberfläche und synthetisiert zahlreiche Zytokine, z. B. IL-2 und IFN- γ , welche die Funktion von Botenstoffen haben. Sowohl diese zusätzlichen Oberflächenmoleküle wie auch die Zytokine dienen dem Informationsaustausch der T-Zelle mit anderen Zellen des Immunsystems. Durch die zusätzlichen Oberflächenmoleküle und die Zytokine lenken die aktivierten T-Zellen die gesamte Antigen-spezifische Immunabwehr. Auf diese Weise wird sowohl die Generierung von zytotoxischen Zellen ("Killerzellen") wie auch die Generierung von Antigen-spezifischen Antikörpern durch B-Zellen gesteuert. Zytotoxische Zellen wie auch die spezifisch gebildeten Antikörper eliminieren virale oder bakterielle Erreger, welche in den Körper eindringen. In einigen Fällen kommt es jedoch zu einem Überschießen der Immunreaktion und das Immunsystem richtet sich gegen die eigenen Körperzellen. Das führt zum Auftreten von "Autoimmunerkrankungen", z. B. zu rheumatoider Arthritis, Morbus Bechterew, Sjögren-Syndrom, Colitis ulcerosa, u. a. Einer der wesentlichen Orte der Kooperation zwischen Antigenaktivierten T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems sind die sekundären lymphatischen Organe, darunter die Tonsillen. Hier werden die T-Lymphozyten durch das von dendritischen Zellen präsentierte Antigen aktiviert, hier interagieren T-Lymphozyten mit B-Zellen. Aufgrund dieser Interaktion sezernieren B-Zellen nach mehreren Zwischenstufen der Differenzierung Antigen-spezifische Antikörper vom IgM- und IgG-Typ.

Das am besten charakterisierte und bisher mit wirksamste ko-stimulatorische Molekül ist das CD28-Oberflächenmolekül (nachstehend CD28-Rezeptor oder CD28 genannt), das auf einem großen Teil der T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. In vivo führt die Ko-Stimulation durch CD28 nach Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor zu einer sehr starken Erhöhung der Zytokin-Sekretion von z. B. IL-2 und IFN- γ wie auch zu einer deutlichen Heraufregulation der Expression von Zelloberflächen-Molekülen wie CD25, CD69, CD71, welche für die Interaktion der T-Zellen mit anderen Immunzellen, z. B. B-Lymphozyten, notwendig sind; vgl. Chambers und Allison, Current Opinion in Immunology 9 (1997), 396-404. Durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor läßt sich das weitere die Proliferation der T-Lymphozyten deutlich steigern.

Auch wird durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor die T-Zell-Steuerung der B-Lymphozyten-Funktion optimiert, daß es zu einer erhöhten Sekretion von Antikörpern kommt. Wenn die Funktion des CD28-Rezeptors aufgehoben wird, kommt es zu einer drastischen Funktionsbeeinträchtigung der Immunabwehr. Das konnte anhand einer transgenen Maus gezeigt werden, in der das CD28-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (ein sogenannter "CD28-knock-out"). Die auf diese Weise gestörte Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen führt zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen und zu einer drastisch verminderten Synthese verschiedener Zytokine. Die fehlende Ko-Stimulation führt letztendlich zu einer verminderten Funktion der Antigen-spezifischen Immunabwehr. So wird u. a. durch das Fehlen von CD28 die Bildung Antigen-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper durch B-Lymphozyten auf 10% des Normwertes reduziert; vgl. Shahinian et al., Science 262 (1993), 609-612; Lucas et al. Journal of Immunology 154 (1995), 5757-5768. Über eine Ko-Stimulation durch CD28 kann man in vitro auch das Eindringen des Aids-Virus in T-Lymphozyten verhindern; vgl. Riley et al., Journal of Immunology 158 (1997), 5545-5553. Entsprechende Versuche sind in vivo noch nicht durchgeführt worden. Bekanntlich schaltet CD28 viele Zytokin-Gene an, die in vivo zu erheblichen Nebenwirkungen führen können. Die Blockade der Rezeptoren von CD28 durch ein lösliches CTLA-4-Immunglobulin-Molekül ist im Affenmodell erfolgreich eingesetzt worden, um die Abstoßung von transplantierten Nieren zu verhindern. Hierbei wurde CTLA-4 in Kombination mit einem Antikörper gegen das CD40-Liganden-Molekül eingesetzt worden; vgl. Kirk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 8789-8794. Die Blockade der CD28-Rezeptoren betrifft jedoch sämtliche T-Lymphozyten und nicht nur die bereits aktivierten, da CD28 auf T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird.

Es besteht somit ein Bedarf an einem ko-stimulierenden Oberflächenmolekül, das nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist, bereitzustellen. Eine wei-

tere Aufgabe der Erfindung ist es, Substanzen B. monoklonale Antikörper gegen das ko-stimulatorische Oberflächenmolekül, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten des Oberflächenmoleküls bereitzustellen. In einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, charakterisiert dadurch, daß a) das Polypeptid auf aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, oder den nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) oder dendritischen Zellen vorkommt, und b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa (Kilodalton) hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-PAGE.

Das erfindungsgemäße Polypeptid (nachstehend auch 8F4-Molekül oder 8F4 genannt) wird erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert, und zwar sowohl auf CD4⁺- wie auch auf CD8⁺-T-Zellen. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE weist das 8F4-Molekül ein Molekulargewicht zwischen etwa 55 und 60 kDa (Kilodalton) auf. Das 8F4-Molekül ist aus zwei Peptidketten zusammengesetzt, wobei die beiden Peptidketten in einer reduzierenden SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 27 und etwa 29 kDa aufweisen. Histologisch kann man das 8F4-Antigen auf aktivierten T-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe der Tonsillen und Lymphknoten eindeutig nachweisen, insbesondere in Keimzentren, dem Ort der Interaktion von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei der Generierung von Antikörpern. Ex vivo isolierte tonsilläre T-Zellen sind zu etwa 50-80% positiv für das 8F4-Antigen und weisen Zeichen einer fortgeschrittenen Aktivierung auf. Das 8F4-Molekül ist auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nicht nachweisbar.

Eine wichtige biologische Aktivität des 8F4-Moleküls ist seine ko-stimulierende Aktivität von T-Lymphozyten. Die ko-stimulierende Aktivität kann bestimmt werden nach Linsley, et al., Journal of Experimental Medicine 176 (1992), 1595-604. Die ko-stimulierende Aktivität des 8F4-Moleküls ähnelt der ko-stimulierenden Aktivität des CD28-Moleküls, welches als zentrales Verstärkungselement der Antigen-Erkennung durch das Immunsystem identifiziert worden ist. Das 8F4-Molekül unterscheidet sich jedoch in vielen Aspekten von CD28. So muß die Expression des 8F4-Moleküls auf der Oberfläche der T-Zellen erst induziert werden, während CD28 konstitutiv exprimiert wird. Auch in der Funktion sind deutliche Unterschiede nachweisbar. Die Ko-Stimulation über CD28 führt zur Überexpression zahlreicher Lymphokine, u. a. des Interleukin-2 (IL-2). Auch die Ko-Stimulation über 8F4 führt zu einer verstärkten Sekretion von Lymphokinen, nicht jedoch des IL-2. Somit unterscheidet sich die ko-stimulatorische Aktivität des 8F4-Moleküls von der Aktivität des CD28-Moleküls. Da die Stimulation über 8F4 nicht alle Zytokin-Gene anschaltet, ist eine Ko-Stimulation über 8F4 in vivo vorteilhaft, z. B. gegenüber einer Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor. Auch unterscheidet sich die Induktion, die Expression, der Expressionsort und die Funktion des 8F4-Moleküls von allen anderen bekannten ko-stimulatorisch wirksamen Molekülen.

Bei dem erfindungsgemäßen 8F4-Molekül handelt es sich um ein neues Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist. Die Expression in vivo deutet u. a. auf eine wesentliche Beteiligung des 8F4-Moleküls an der Kooperation von T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems wie B-Zellen oder dendritischen Zellen im Rahmen der humoralen und zellulären Immunabwehr gegen Viren und Bakterien hin.

Nach Expression hat das 8F4-Molekül in vitro eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf verschiedene Funktionen der T-Lymphozyten:

1. Deutliche Verstärkung der Proliferation von T-Lymphozyten.
2. Deutliche Verstärkung der Synthese bestimmter Zytokine durch die T-Lymphozyten.
3. Stark erhöhte Expression von Steuerungs-Molekülen, z. B. Oberflächenmoleküle und Zytokine, auf und in T-Lymphozyten.
4. Deutliche Verbesserung der T-Zell-induzierten Antikörper-Bildung (IgM und IgG) durch B-Zellen.

Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin bereit, ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon. Ein biologisch aktives Fragment oder Analogon ist ein Fragment oder Analogon, das ebenfalls eine ko-stimulatorische Wirkung auf T-Zellen-Lymphozyten zeigt oder zumindest im Sinne einer Blockade eine biologische Wirkung entfaltet. Bevorzugt ist ein Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon, das mindestens 60% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Polypeptid eine Aminosäuresequenz, die mindestens 80% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon.

Insbesondere bevorzugt ist ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

Die Erfindung schließt ein allele-Varianten, Fragmente und Analoga von dem 8F4-Molekül. Diese Varianten schließen ein natürlich vorkommende allele-Varianten, Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren. Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren. Deletionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren deletiert worden sind und Additionsanaloga, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren hinzugefügt worden sind. Deletion und Addition von einer oder mehreren Aminosäuren können entweder an einer internen Region des Polypeptids oder an dem Amino- oder Carboxyterminus gemacht werden.

Erfindungsgemäße Polypeptide, fusioniert zu heterologen Polypeptiden, werden ebenfalls umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf DNA-Sequenzen, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon kodieren. Diese DNA-Sequenzen schließen die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) genauso wie alle Varianten, Fragmente, und Analoga mit biologischer Aktivität ein. Bevorzugt ist eine DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
- b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
- c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen in (a) und (b) hybridisieren. Vorzugsweise hybridisieren die vorstehenden DNA-Sequenzen zueinander unter stringenten Bedingungen.

Weiterhin werden bereitgestellt Vektoren, die diese DNA-Sequenzen enthalten und Wirtszellen, die mit diesen Vektoren transformiert oder transfiziert sind.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können auf übliche Weise nach dem von Milstein und Köhler, Nature 256 (1975), 495-497, beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Insbesondere können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper hergestellt werden, indem Mäuse mit T-Zellen, die in vitro mit Phorbolmyristatacetat (PMA) und Ionomycin ("2-Signal-System") für 24 h aktiviert worden sind, immunisiert werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse werden mit Myelom-Zellen fusioniert. 8F4-spezifische monoklonale Antikörper werden dadurch identifiziert, daß sie 2-Signal-aktivierte, jedoch nicht ruhende T-Lymphozyten erkennen. Auch färben 8F4-spezifischen Antikörper mit einem Signal (entweder PMA oder Ionomycin) stimulierte T-Zellen in einem auf übliche Weise durchgeführten Nachweisverfahren nicht an. 8F4-spezifische Antikörper ergeben ein typisches Anfärbemuster von tonsillären T-Zellen und erkennen ein Antigen von etwa 55 bis 60 kDa in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE und von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa in einer reduzierenden SDS-PAGE auf aktivierten T-Lymphozyten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Hybridomzellen, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper herstellen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, als Arzneimittel. Besonders bevorzugt ist Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, natürlicher oder synthetischer Liganden, Agonisten oder Antagonisten des 8F4-Moleküls. Diese Substanzen können als Arzneimittel verwendet werden, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunerkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Die Blockade der Interaktion des 8F4-Antigens mit seinem Rezeptor verbessert z. B. die Verhinderung der Organabstoßung, da eine solche Blockade nur bereits aktivierte T-Lymphozyten betrifft. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids als Arzneimittel. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Polypeptid, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann ebenfalls auf übliche Weise in Zellen eingeführt werden so daß diese Zellen das Polypeptid z. B. konstitutiv exprimieren. Z. B. kann die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz oder ein Vektor, umfassend die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz benötigten Elemente, in eine Zelle eingeschleust werden. Enhancer und andere für die Expression der Nukleinsäuresequenz benötigten Elemente, in eine Zelle eingeschleust werden. Vorzugsweise wird die 8F4 cDNA (2641 Nukleotide), dargestellt in Fig. 16 (SEQ ID NO: 1), oder Fragmente oder Derivate hiervon zur Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Fragmenten hiervon eingesetzt.

Ferner kann das erfindungsgemäße Polypeptid z. B. mittels Liposomen in Zellen eingeführt werden, die das Polypeptid danach auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Erfindungsgemäß können diese Zellen als Arzneimittel verwendet werden, insbesondere zur Wiederherstellung der korrekten Regulation des menschlichen Immunsystems, wie sie im Rahmen zahlreicher chronischer Infektionserkrankungen auftritt, z. B. im Rahmen von AIDS, Asthmaerkrankungen oder bei chronischen viralen Hepatiden (z. B. HCV, HBV), oder zur Stimulation des Immunsystems in vitro oder in vivo, wie z. B. für die Therapie von Krebserkrankungen verwendet werden.

In einer weiteren Ausführungsform werden Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist verwendet, wobei die Substanzen insbesondere einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen. Zur Diagnose kann z. B. ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet werden. Die Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid erkennen, umfassen auch Nukleinsäuresequenzen, wobei diese vorzugsweise zur Hybridisierung und/oder zur Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Amplifikation (z. B. PCR) eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Polypeptid oder Fragmente hiervon durch ein transgenes Tier exprimiert.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Erfindung ein transgenes Tier bei dem das Gen, das für das erfindungsgemäße Polypeptid kodiert, ausgeschaltet worden ist ("Knock-out").

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung:

Fig. 1 zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitation des 8F4-Antigens aus aktivierten humanen T-Zellen. (a) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 12% Polyacrylamidgel (PAA-Gel)) reduzierend. (b) SDS-PAGE (10% PAA-Gel) nicht reduzierend. Angegeben sind die Bedingungen zur Elution des Antigens von der 8F4-Matrix. "SDS" bedeutet Natriumdodecylsulfat; "DTT" bedeutet Dithiothreitol. "Mr" bedeutet Molekulargewicht und "kDa" bedeutet Kilodalton.

A
S

Fig. 2a zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen ist in Klammern angegeben. "PMA" bedeutet Phorbolmyristatacetat; "PHA" bedeutet Phytohemagglutinin; "OKT3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD3; "MLR" bedeutet gemischte Lymphocytenreaktion (engl.: mixed lymphocyte reaction); "mAK 9.3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD28; "SEB" bedeutet *Staphylococcus enterotoxin B*.

Fig. 2b zeigt das Ergebnis einer Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin in einer Durchflußzytometrie. Aufgetragen ist die Immunfluoreszenz (log) gegen die Zellzahl.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind. "bio" bedeutet biotinylierter Antikörper.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer histochemischen Untersuchung zur Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

Fig. 5 zeigt das Ergebnis einer Expressions-Analyse von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen in einer Durchflußzytometrie. "bioPE" bedeutet biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin Sekundärreagenz.

Fig. 6 zeigt die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern (CD69, CD45) in einer Durchflußzytometrie.

Fig. 7 zeigt schematisch die verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4. Offene Kreise (O) stehen für 8F4 Antikörper, Dreiecke (Δ) stehen für unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps; ausgefüllte Kreise (●) stehen für anti-CD28-Antikörper-9.3.

Fig. 8 zeigt einen schematischen Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28. "mAK" bedeutet monoklonaler Antikörper; "ATAC" bedeutet "Activation induced T cell derived And Chemokine related"; "cpm" bedeutet radioaktive Zerfälle pro Minute.

Fig. 9 zeigt schematisch die Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen. "ng" bedeutet Nanogramm; "ml" bedeutet Milliliter; "mAK" bedeutet monoklonaler Antikörper.

Fig. 10 zeigt schematisch die Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Fig. 11 zeigt die Expression des 8F4-Antigens auf der MOLT-4V-Zelllinie. MOLT-4V-Zellen wurden mit einem Fluorescein-markierten 8F4-Antikörper (8F4-FITC) gefärbt und in der Durchflußzytometrie untersucht (offene Linie, im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (ausgefüllte Linie)).

Fig. 12 zeigt die zweidimensionale Gelelektrophorese. Ein MOLT-4V Zell-Lysat aus 300×10^6 Zellen wurde wie beschrieben immunpräzipitiert. Das Eluat wurde auf einer nicht reduzierenden SDS-PAGE (10% PAA) aufgetrennt und der Bereich um 60 kDa aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Reduktion der Disulfidbrücken im 8F4-Molekül wurde das Gelstück für 1 h bei 50°C in 5.3 M Harnstoff, 0.5 M Tris, pH 8.0, 1% SDS, 1% β-Mercaptoethanol inkubiert und die freien Cysteinreste im Molekül mit 10 mM Iodoacetamid (Sigma, Deisenhofen) alkyliert (30 min, 37°C). Das Gelstück wurde für weitere 30 min. in 1x SDS-PAGE Probenpuffer equilibriert und auf einem 12% PAA-SDS-Gel (mit Sammelgel) montiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen. Die Lage des 8F4-Proteins wurde durch Oberflächeniodinierung bestimmt (vgl. Fig. 1) und ist durch Umkreisung markiert. (Alle nicht im Detail beschriebenen Prozeduren wurden nach Standardmethoden durchgeführt, siehe z. B. Westermeier, R., *Electrophoresis in Practice*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997).

Fig. 13 zeigt eine Hybridisierung mit Oligo 1 (SEQ ID NO: 3). Auf Nitrocellulose-Filter immobilisierte Lambda-Klone wurden mit Oligo 1 wie in den Beispielen beschrieben hybridisiert. Dargestellt ist die Exposition auf einem Röntgenfilm (Ausschnitt).

Fig. 14 zeigt eine Northern-Blot Analyse mit der 8F4-cDNA. Die Hybridisierung eines Northern-Blots mit der 8F4-cDNA ergibt eine Bande, die im Gel zwischen der 18S und 28S RNA läuft. In Fig. 14A ist das Verhalten als 2-Signal-abhängiges (s. o.) Aktivierungsantigen gezeigt: Keine Expression in ruhenden lymphoiden Zellen (PBL), starke Expression in PMA-Ionomycin aktivierten CD4⁺ T-Zellen und deutlich verringerte Expression mit PMA bzw. Ionomycin alleine. Fig. 14B zeigt die Expressionsstärke der mRNA nach unterschiedlichen Stimulationszeiten (T-Zellen (über Nylonwool) adhärent aufgereinigt, NTC), stimuliert mit PMA-Ionomycin). Daneben die MOLT-4-Zelllinien (ATCC CRL-1582), die nur eine minimale Expression zeigt, ganz rechts die für die Klonierung verwendete MOLT-4V, die ein deutliches Signal zeigt. Aufgetragen ist außerdem die RNA weiterer Zelllinien, auf denen in der durchflußzytometrischen Analyse keine 8F4-Expression nachweisbar war: CEM (ATCC CCL-119), HLJ-102 (ATCC TIB-162), HUT-78 (ATCC TIB-161), Jurkat (ATCC TIB-152), DG75 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ACC83), Karpas 299 (Fischer, P. et al. (1988), *Blood*, 72 : 234-240), DEL (Barbey, S. et al. (1990), *Int. J. Cancer*, 45: 546-553).

Fig. 15 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptids 8F4 (SEQ ID NO: 2).

Fig. 16 zeigt die 8F4 cDNA (SEQ ID NO: 1).

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

Beispiel 1: Generierung des 8F4-Antikörpers

Balb/c Mäuse wurden mit humanen T-Zellen immunisiert, welche vorher für 24 h mit 33 ng/ml des Phorbolesters Phorbolmyristatacetat (PMA), (Sigma, Deisenhofen), und mit 200 ng/ml des Ca²⁺-Ionophors Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) aktiviert worden sind (sogenannte "2-Signal-Aktivierung"). Nach dreimaligem Boostern wurden die Milzzellen der Mäuse mit dem Myelom PJX63 Ag8.653 (ATCC Nr. CRL-1580) fusioniert und Antikörper-sekretierende Hybridome nach Standardmethoden generiert; vgl. Peters und Baumgarten, *Monoclonal Antibodies*. Springer, Heidelberg, 1992. Das Durchmustern der erhaltenen Antikörper erfolgte auf aktivierten versus ruhenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie. Aktivierte ("2-Signal-Aktivierung") und ruhende T-Zellen wurden mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert; vgl. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*, Wiley-Liss, New York, 1995. Nur die Antikörper, welche Moleküle erkannten, die ausschließlich durch PMA und

das Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin auf der T-Zell-Oberfläche induziert wurden, jedoch nicht durch eines der Agenzien alleine ("2-Signal-Moleküle") wurden für eine weitere Reinigung ausgewählt. Die erhaltenen Antikörper wurden in der Durchflußzytometrie auf Ähnlichkeit bzw. Verschiedenheit zu bekannten Antikörpern gegen Aktivierungsmoleküle (vgl. Tabelle 1) auf T-Zellen untersucht. Kriterien waren hierbei neben der schon oben erwähnten "2 Signal-Abhängigkeit" die Kinetik der Induktion auf stimulierten T-Zellen und die Expression auf verschiedenen Zelllinien.

Beispiel 2: Immunpräzipitation des 8F4-Antigens

Oberflächenmoleküle von aktivierten humanen T-Zellen wurden mit ^{125}I nach Standardmethoden iodiniert und mit dem Antikörper 8F4 nach Standardmethoden immunpräzipitiert; vgl. Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, Academic Press, London, 1996. Für die Immunpräzipitation wurde der Antikörper nach Schneider et al., Journal of Biological Chemistry 257 (1982), 10766-10769, an Protein G (Pharmacia, Freiburg) gekoppelt (8F4-Matrix). Das Waschen der Matrix erfolgte nach Schneider et al., siehe vorstehend. Das immunpräzipitierte 8F4-Molekül wurde auf übliche Weise in der SDS-PAGE (nicht reduziert und reduziert) auf seine molekulare Masse analysiert; Goding, siehe vorstehend.

Beispiel 3: Durchflußzytometrie

Die Analyse der 8F4-tragenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie erfolgte nach Standardmethoden; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry, Wiley-Liss, New York, 1995.

Ausführungsbeispiel 3.1: Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4^+ -T-Zellen

CD4^+ -T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Agenzien in üblicher Weise stimuliert und auf Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie nach üblichem Verfahren untersucht. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen betrug mit den verschiedenen Agenzien zwischen 24 Stunden und 144 Stunden. Aktivierungsmodi: Phorbol-myristatacetat (PMA; 33 ng/ml), Ionomycin (200 ng/ml), Phytohaemagglutinin (PHA 1,5 mg/ml), OKT3 (monoklonaler Antikörper gegen CD3), gemischte Lymphocytenreaktion (MLR, "mixed lymphocyte reaction" zwischen 50 000 CD4^+ -T-Zellen und 100 000 B-Zellen), mAk 9.3 (monoklonaler Antikörper gegen CD28), Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 0,1 ng/ml). Die Auswertung ergab, daß verschiedene Stimuli geeignet sind, das 8F4-Molekül auf T-Zellen zu induzieren, jedoch in unterschiedlicher Expressionsdichte. Am potentesten sind neben den stark wirksamen pharmakologischen Agenzien PMA und Ionomycin solche Stimuli, die eine ko-stimulatorische Situation darstellen, wie z. B. akzessorische Zellen in der MLR oder der ko-stimulierende mAk 9.3.

Ausführungsbeispiel 3.2: Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4^+ -T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin

CD4^+ -T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) in üblicher Weise stimuliert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie in üblicher Weise untersucht. Das Molekül ist bereits nach vier Stunden auf der Oberfläche detektierbar, gehört also zur Klasse der relativ frühen Aktivierungsantigene. Auch nach 48 Stunden wird das Antigen noch gut exprimiert.

Ausführungsbeispiel 3.3: Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind

50 000 CD4^+ -T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit 100 000 allophen tonsillären B-Zellen für 6 Tage ko-kultiviert (37°C, 5,2% CO_2 , 200 µl RPMI 1640 mit 10% FCS in 96-Well-Rundbodenplatten) und danach auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie untersucht. Zu Beginn der Kultivierung wurden verschiedene Antikörper (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCI; alle 10 mg/ml) der Kultur hinzugefügt, um die Abhängigkeit der 8F4-Induktion von diesen Molekülen zu überprüfen. Die Expression von 8F4 läßt sich nur durch Blockade der CD86/CD28-Interaktion blockieren, nicht jedoch durch Blockade von CD80. Der Blockade-Effekt ist hierbei noch stärker als die Blockade von MHCI (Positivkontrolle).

Ausführungsbeispiel 3.4: Expression von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen

B-Zellen bzw. T-Zellen aus tonsillärem Gewebe von verschiedenen Quellen wurden auf übliche Weise gereinigt und in der Durchflußzytometrie auf die Expression des 8F4-Moleküls untersucht. Während auf B-Zellen das Signal nicht eindeutig signifikant war, exprimierten etwa 50-80% der tonsillären T-Zellen das 8F4-Molekül in unterschiedlicher Dichte. Es lassen sich hierbei zwei Populationen unterschiedlich hoher Fluoreszenz (8F4-"high" bzw. "low") erkennen, deren Ausprägung bei den verschiedenen Tonsillen unterschiedlich ist. So weist z. B. Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"low"- und andere Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"high"-Population auf.

Ausführungsbeispiel 3.5: Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern

Aus humanen Tonsillen gereinigte T-Zellen wurden in der 2-Farben-Durchflußzytometrie auf die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern analysiert. In Tonsillen wird 8F4 ko-exprimiert mit CD69 wie auch mit Varianten des CD45-Moleküls. Hierbei sind die 8F4-"high"-Zellen eindeutig mit einer CD45RO-Expression korreliert, während die 8F4-negativen Zellen den Phänotyp CD45RA tragen. CD45RA wird hauptsächlich von sogenannten "naï-

ven" T-Zellen exprimiert, wohingegen CD45RO mit einer Effektorzellfunktion assoziiert ist. Es handelt sich also bei den 8F4⁺-Zellen hauptsächlich um "reife" T-Zellen. CD45RO und CD45RA sind Isoformen von CD45.

Beispiel 4: Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille

Tonsilläres Gewebe in Gefrierschnitten wurde mit dem 8F4-Antikörper in der APAAP-Technik (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) nach Standardverfahren angefärbt. 8F4⁺-Zellen wurden vorzugsweise im Keimzentrum der Tonsillen vorgefunden, aber z. T. auch in der T-Zell-Zone der Tonsillen.

Beispiel 5: Ko-Stimulation von T-Lymphozyten

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT3 (verschiedene Verdünnungen eines Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle wurden der OKM1 Antikörper oder der 2A11 Antikörper (beide 2 µg/ml) verwendet.

Ausführungsbeispiel 5.1: Verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4

Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers OKT3 aktiviert und gleichzeitig mit dem 8F4-Antikörper oder einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps ko-stimuliert. Als Vergleich wurde die Ko-stimulation mit dem anti-CD28-Antikörper-9.3, einem der stärksten bekannten ko-stimulatorischen Antikörper, durchgeführt. Selbst bei optimaler Stimulation über CD3 ist sowohl mit dem mAk 8F4 als auch mit mAk 9.3 noch ein Ko-stimulatorischer Effekt zu sehen. Im suboptimalen OKT3-Bereich, d. h. dem Bereich, in dem ohne Ko-Stimulation keine volle T-Zellaktivierung mehr erzielt werden kann, können beide Antikörper die Expression anderer Aktivierungsantigene um den Faktor 4 bis 100 steigern, wobei die Wirkung des anti-CD28-Antikörpers auch noch bei sehr hohen OKT3-Verdünnungen sichtbar wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei sehr schwacher OKT3-Stimulation das 8F4-Antigen nicht mehr auf die Zelloberfläche gebracht und somit auch nicht vom mAk 8F4 kreuzvernetzt werden kann.

Ausführungsbeispiel 5.2: Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28

Gereinigte CD8⁺-T-Zellen wurden für 51 h mit einer suboptimalen Konzentration des monoklonalen Antikörpers OKT3 stimuliert. Als Ko-Stimulatoren wurden Antikörper 8F4, Antikörper 9.3 (anti-CD28) und Isotypkontrollen eingesetzt (jeweils 2 µg/ml). Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde die Proliferationsrate der T-Zellen durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt. In Parallelkulturen wurde der Überstand entfernt und die Konzentration der Zytokine ATAC/Lymphotactin und IL-2 bestimmt. Bezüglich der IL-2-Synthese unterscheiden sich 8F4 und CD28 sehr stark voneinander. CD28-Ko-Stimulation führt, wie auch im Stand der Technik beschrieben (Chambers und Allison, Current Opinion in Immunology 9 (1997), 396-404), zu einer sehr starken IL-2 Sekretion. Mit 8F4 hingegen liegt die IL-2 Produktion unterhalb der Nachweisgrenze. Die Proliferation ist jedoch in beiden Ansätzen vergleichbar, das autokrine Wachstum der T-Zellen muß also bei 8F4-Ko-Stimulation auf andere Faktoren zurückgeführt werden. Auch in bezug auf die Sekretion des Lymphokins ATAC unterscheiden sich die beiden Antikörper in der ko-stimulatorischen Wirkung kaum.

Beispiel 6: Bestimmung der von B-Zellen synthetisierten Immunglobuline nach Interaktion mit 8F4-ko-stimulierten T-Zellen

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT3 (1 : 500 bis 1 : 80 000 Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle wurde der OKM1-Antikörper oder der 2A11-Antikörper verwendet. In einigen Experimenten wurde zum Vergleich eine Ko-Stimulation mit einem CD28-spezifischen Antikörper ("9.3") durchgeführt; vgl. Hara et al., Journal of Experimental Medicine 161 (1985), 1513-1524. In die so vorbereiteten Kulturplatten wurden pro well 50 000 gereinigte (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4⁺-T-Zellen (>95% Reinheit) aus dem peripheren Blut und 25 000 allogene tonsilläre B-Zellen (negativ-Selektion durch T-Zell-Rosettierung mit Schafserythrocyten, 96% Reinheit) pipettiert und für 8 Tage ko-kultiviert. Nach dieser Zeitdauer wurde der Überstand entnommen und auf die Konzentration sezernierter Immunglobuline vom IgM- und IgG-Typ im ELISA auf übliche Weise analysiert; vgl. Nisboka and Lipsky, Journal of Immunology 153 (1994), 1027-1036.

Ausführungsbeispiel 6.1: Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen

Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden für 8 Tage mit allogenen B-Zellen aus Tonsillen in üblicher Weise ko-kultiviert. Bei einer suboptimalen Stimulation der T-Zellen mit dem OKT3-Antikörper verstärkte die Ko-Stimulation der T-Zellen durch 8F4 die Sekretion der IgM- und IgG-Immunglobuline um den Faktor 40.

Beispiel 7: Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4

Periphere T-Zellen (über Nylonwolladhärenz in üblicher Weise aufgereinigt) wurden für 20 h mit PHA (1.5 mg/ml)

stimuliert und über 6 Tage mit IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch OKT3 mit und ohne Ko-Stimulation durch mAk 8F4 (2 µg/ml) resstimuliert. Die Apoptose wurde durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid in der Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt. Bei suboptimaler Stimulation über den T-Zellrezeptor-Komplex kann Ko-Stimulation über 8F4 den Anteil apoptotischer Zellen um den Faktor 4 senken.

A8

Beispiel 8: Klonierung der für das 8F4-Protein kodierenden cDNA

Durch Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten 8F4-Antikörper wurde in der Durchflußzytometrie eine Zelllinie (MOLT-4V) identifiziert, die das 8F4-Antigen konstitutiv exprimiert (Fig. 11). Bei der Linie MOLT-4V handelt es sich um eine Variante der humanen T-Zelllinie MOLT-4 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1582).

Diese Zelllinie wurde für die präparative Aufreinigung des 8F4-Antigens mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers verwendet:

Die Zellen wurden im großen Maßstab (150 l) in Roller Kulturfラスchen kultiviert, abzentrifugiert und die zellulären Proteine mit einem Lysepuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen), 1% NP-40 (Boehringer, Mannheim)) extrahiert. Zellkerne und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation entfernt. Das so gewonnene Zell-Lysat wurde für 2 h mit Sepharose CL4-B (Pharmacia, Freiburg) präinkubiert, um unspezifisch an Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der bereits in Beispiel 2 beschriebenen 8F4-Immunaффinitätsmatrix (4 h bei 4°C). Die Matrix wurde in eine Säule gefüllt und nun mehrfach unter Bedingungen gewaschen, die eine ausschließliche Entfernung von unspezifisch bindenden Proteinen bedingt (1.50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40; 2. 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40, 0,1% SDS; 3. 0,2 M Glycin pH 4,0, 0,5% CHAPS (Merck, Darmstadt)). Die Elution des 8F4-Antigens von der Matrix erfolgte mit 0,2 M Glycin, pH 2,5, 0,5% CHAPS. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration eingeeengt (Amicon Centricon 10, Millipore, Eschborn).

Um eine weitere Aufreinigung des 8F4-Moleküls zu erzielen, wurde die dimere Struktur des Moleküls (siehe Fig. 1) in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (nicht reduzierend/reduzierend) ausgenutzt. Da die meisten Proteine als Monomer vorkommen, laufen sie in der Gelelektrophorese auf einer Diagonale, das 8F4-Molekül dagegen läuft in der 1. Dimension (nicht reduzierend) bei 55–60 kDa und in der 2. Dimension (reduzierend) bei 27 und 29 kDa (Fig. 12).

Für die präparative Auftrennung wurden die Immunpräzipitate von jeweils 20×10^9 Zellen wie vorstehend bei der Beschreibung der Fig. 12 dargestellt in der Zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel mit Coomassie Blau G250 (Biorad, München) gefärbt und die in Fig. 12 bezeichneten Areale aus dem Gel getrennt ausgeschnitten (8F4-27kDa bzw. 8F4-29kDa).

Für die Peptidmikrosequenzierung wurden die Proteine aus jeweils 4 Gelstücken mit Trypsin verdaut und aus dem Gel eluiert. Die tryptischen Fragmente wurden über HPLC aufgetrennt und einzelne Fraktionen einer Edman-Degradation unterzogen (Verfahren ausführlich beschrieben in Grocuzup, M. et al. (1996), Eur. J. Immunol., 26: 863–869).

Aus der Sequenzierung der 8F4-29kDa Probe wurde neben Bruchstücken bekannter Proteine eine Peptidsequenz XRLTDVT gefunden, für die in sämtlichen Proteinatendatenbanken kein Korrelat im humanen Bereich gefunden wurde.

Eine eindeutige Rückübersetzung einer Proteinsequenz in eine DNA-Sequenz ist nicht möglich. So ergibt die Rückübersetzung der obigen Peptidsequenz in ein Oligonucleotid mit 17 Nucleotiden eine Zahl von 2048 Permutationen. Ein spezielles Verfahren (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182: 738–751) ermöglicht jedoch das Screening einer cDNA Bank mit degenerierten Oligonucleotiden. Auf Basis der gefundenen Peptidsequenz wurden 2 Oligonucleotide (Oligo 1 (SEQ ID NO:3): MGN CTS ACN GAY GTN AC, 512 Permutationen; Oligo 2 (SEQ ID NO:4): MGN YTD ACN GAY GTN AC, 1024 Permutationen) synthetisiert.

Für das Screening wurde eine cDNA Bank aus der auch für die Proteinaufreinigung verwendeten MOLT-4V Zelllinie konstruiert:

Gesamt-RNA wurde nach der Guanidinium/CsCl-Methode (Chirgwin, J.M. et al. (1979), Biochemistry 18: 5294–5299) isoliert, mRNA über Oligo-dT-Cellulose-Säulen (Gibco BRL, Eggenstein) angereichert. Die Erst- und Zweit-Strang cDNA Synthese wurde unter Verwendung eines kommerziellen cDNA-Synthesesystems (Gibco BRL, Eggenstein) unter Verwendung von Oligo-dT-Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die cDNA wurde über EcoRI-Adaptoren in den Lambda ZAPH Vektor (Stratagene, Heidelberg) ligiert.

Die cDNA-Bank wurde gemäß Standardmethoden (Vogeli, G. and Kaytes, P.S. (1987), Methods Enzymol., 152: 407–515) platiert und die Lambda-DNA auf Nitrocellulose-Filtern (Optiuran BA-S 85, Schleicher & Schuell, Dassel) immobilisiert.

Die oben genannten Oligonucleotide wurden unter Verwendung von T4 Polynucleotidkinase (NEBL, Schwalbach) und γ -³²P ATP (NEN Du Pont, Brüssel) radioaktiv markiert (Wallace, R.B. and Miyada, C.G. (1987), Methods Enzymol., 152: 432–442).

Die Hybridisierung der Filter erfolgte in einem für degenerierte Oligonucleotide beschriebenen Puffer (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182: 738–751) mit 3 M Tetramethylammoniumchlorid (Roth, Karlsruhe) bei 48°C. Die Filter wurden, wie in der o.g. Referenz beschrieben, gewaschen, wobei die Waschttemperaturen 50°C betrug. Nach Exposition der Filter auf einem Röntgenfilm zeigten sich ca. 50 positive Klone pro 100 000 plattierter Phagen (Fig. 13).

6 Klone wurden weiter charakterisiert, indem sie nach der vom Hersteller des Vektors (Stratagene, Heidelberg) beschriebenen Methode durch in vivo Excision in einen Plasmidvektor überführt wurden und mit T3 und T7 Primern ansequenziert wurden (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA). Einer der Klone enthielt eine Sequenz, deren Translation genau die gesuchte Peptidsequenz ergab. Dieser Klon wurde zur Hybridisierung eines Northern Blots (Fig. 14) verwendet (Kroczeck, R.A. (1993), J. Chromatogr., 618, 133–145). Das Expressionsmuster der mRNA entsprach genau der Expression des 8F4-Moleküls, wie es aus durchflußzytometrischen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper bekannt war. Da der gefundene Klon nur das 3'-Ende der gesuchten cDNA enthielt, wurde ein 5'-gelegenes Fragment zur Isolierung der gesamten 8F4 cDNA verwendet. Mehrere Klone wurden auf beiden Strängen sequenziert.

A
9

Die 8F4 cDNA (2641 Nucleotide) ist in Fig. 16 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:1 dargestellt und codiert für ein Protein mit 199 Aminosäuren (Nucleotide 68-664), dargestellt in Fig. 15 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:2. Die Sequenzierung mehrerer unabhängiger Klone aus der cDNA-Bank ergab einige Abweichungen von der hier gezeigten Sequenz, die jedoch alle in der 3'-untranslatierten Region liegen:
 Pos. 909-910: Deletion Pos. 1631: T->C
 Pos. 2074: G->T
 Pos. 2440: G->C
 Pos. 2633: alternative Polyadenylierungsstelle

Tabelle 1

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper (Klon), deren Herkunftsquelle (Quelle), die Spezifität gegen ihr jeweiliges Antigen (Spezifität) und gegebenenfalls ihre Markierung (Label) wider.

Spezifität	Label	Isotyp	Klon	Quelle
CD3	Cy-Chrome	IgG1	UCHT1	Pharmingen, Hamburg
CD3	-	IgG2a	OKT3	ATCC CRL-8001
CD11b	-	IgG2b	OKM1	ATCC CRL-8026
CD25	FITC	IgG2a	BL49.9	Immunotech, Hamburg
CD28	-	IgG2a	9.3	Immunex Corp., Seattle
CD45RA	Cy-Chrome	IgG2b	HL100	Pharmingen, Hamburg
CD45RO	FITC	IgG2a	UCHL1	Immunotech, Hamburg
CD69	FITC	IgG1	FN50	Pharmingen, Hamburg
CD80	-	IgG1	L307.4	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	-	IgG2b	IT2.2	Pharmingen, Hamburg
CD154	FITC	IgG1	TRAP-1	Hybridom ¹
MHCII	-	IgG2a	L243	ATCC HB-55
8F4	-	IgG1	8F4	Hybridom ¹
8F4	Biotin	IgG1	8F4	Hybridom ¹
Isotyp IgG1	-	IgG1	2A11	Hybridom ^{1,2}
Isotyp IgG1	FITC	IgG1	2A11	Hybridom ^{1,2}
Isotyp IgG1	Biotin	IgG1	ASA-1	Hybridom ¹

¹ Die Hybridomzelllinie wurde auf übliche Weise generiert, der Antikörper aufgereinigt und gegebenenfalls markiert.

² gerichtet gegen ein synthetisches Peptid

Die in den Beispielen verwendeten Antiseren und Sekundärreagenzien wurden bezogen von: Ziege-anti-Maus-Ig, FITC-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Streptavidin, PE-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Kaninchen-anti-Maus-Ig-Fraktion, von Sigma, Deisenhofen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME:Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten
durch
den Direktor des Robert-Koch-Instituts
Nordufer 20

(B) STRASSE:

Berlin

(C) ORT:

Berlin

(D) BUNDESLAND:

Deutschland

(E) LAND:

13353

(F) POSTLEITZAHL:

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ko-stimulierendes Polypeptid von T-
zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRAEGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:
ANMELDENUMMER:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2641 Basenpaare

(B) ART: Nucleotide

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGAGAGCCTG AATTCAGTGT CAGCTTTGAA CACTGAACGC GAGGACTGTT AACTGTTTCT	60
GGCAAACATG AAGTCAGGCC TCTGGTATTT CTTTCTCTTC TGCTTGCGCA TTAAAGTTT	120
AACAGGAGAA ATCAATGGTT CTGCCAATTA TGAGATGTTT ATATTCACA ACGGAGGTGT	180
ACAAATTTTA TGCAAATATC CTGACATTGT CCAGCAATTT AAAATGCAGT TGCTGAAAGG	240
GGGGCAAATA CTCTGCGATC TCACTAAGAC AAAAGGAAGT GGAAACACAG TGTCCATTAA	300
GAGTCTGAAA TTCTGCCATT CTCAGTTATC CAACAACAGT GTCTCTTTTT TTCTATACAA	360
CTTGGACCAT TCTCATGCCA ACTATTACTT CTGCAACCTA TCAATTTTGT ATCCTCCTCC	420
TTTTAAGTA ACTCTTACAG GAGGATATTT GCATATTTAT GAATCACAAC TTTGTTGCCA	480
GCTGAAGTTC TGGTTACCCA TAGGATGTGC AGCCTTTGTT GTAGTCTGCA TTTGGGGATG	540
CATACTTATT TGTGGCTTA CAAAAAGAA GTATTCATCC AGTGTGCACG ACCCTAACGG	600
TGAATACATG TTCATGAGAG CAGTGAACAC AGCCAAAAA TCTAGACTCA CAGATGTGAC	660
CCTATAATAT GGAACCTCTG CACCCAGGCA TGAAGCACGT TGGCCAGTTT TCCTCAACTT	720

GRAAGTGCAG ATTCTCTTAT TTCGGGACC ACGGAGAGTC TGACTTAACT AC CATCT 780
 TCTGCTGGTG TTTTGTTCAT TCTGGAAGAA TGACTGTATC AGTCAATGGG GATTTTAAAC 840
 GACTGCCTTG GTACTGCCGA GTCCTCTCAA AACAAACACC CTCTTGCAAC CAGCTTTGGA 900
 GAAAGCCCAG CTCCTGTGTG CTCACTGGER GTGGAATCCC TGTCTCCACA TCTGCTCCTA 960
 GCAGTGCATC AGCCAGTAAA ACAACACAT TTACAAGAAA AATGTTTTAA AGATGCCAGG 1020
 GGTACTGAAT CTGCAAAGCA AATGAGCAGC CAAGGACCAG CATCTGTCCG CATTTCATA 1080
 TCATACTACC TCTTCTTTCT GTAGGGATGA GAATTCCTCT TTTAATCAGT CAAGGGAGAT 1140
 GCTTCAAAGC TGGAGCTATT TTATTTCTGA GATGTTGATG TGAACGTGAC ATTAGTACAT 1200
 ACTCAGTACT CTCCTTCAAT TGCTGAACCC CAGTTGACCA TTTTACCAAG ACTTAGATG 1260
 CTTTCTGTG CCTCAATTT TCTTTTAAA AATACTTCTA CATGACTGCT TGACAGCCCA 1320
 ACAGCCACTC TCAATAGAGA GCTATGTCTT ACATTCTTTC CTCGTCTGCT CAATAGTTTT 1380
 ATATATCTAT GCATACATAT ATACACACAT ATGTATATAA AATTCATAAT GAATATATT 1440
 GCCTATATTC TCCCTACAAG AATATTTTTG CTCCAGAAAG ACATGTTCTT TTCTCAAAT 1500
 CAGTAAAAAT GGTACTTTT GTTCAAGTTA GTGGTAGGAA ACATTGCCCG GAATTGAAAG 1560
 CAAATTTATT TTATTATCCT ATTTTCTACC ATTATCTATG TTTTCATGGT GCTATTAAT 1620
 ACAAGTTTAG TTCTTTTGT AGATCATATT AAAATTGCAA ACAAAATCAT CTTTAATGGG 1680
 CCAGCATTCT CATGGGGTAG AGCAGAATAT TCATTTAGCC TGAAAGCTGC AGTTACTATA 1740
 GGTGCTGTC AGACTATACC CAIGGTGCCT CTGGGCTTGA CAGGTCAAAA TGGTCCCCAT 1800
 CAGCCTGGAG CAGCCCTCCA GACCTGGGTG GAATTCAGG GTGAGAGAC TCCCCTGAGC 1860
 CAGAGGCCAC TAGGTATTCT TGCTCCCGA GGCTGAAGTC ACCCTGGGAA TCACAGTGGT 1920
 CTACCTGCAT TCATAATTC AGGATCTGTG AAGAGCACAT ATGTGTCAGG GCACAATTC 1980
 CTCTCATAAA AACCACACAG CCTGGAAAT GGCCCTGGCC CTTCAAGATA GCCTTCTTTA 2040
 GAATATGATT TGGCTAGAAA GATCTTAAA TATGTGGAAT ATGATTATTC TTAGCTGGAA 2100
 TATTTTCTCT ACTTCCTGTC TGCTGCCCCA AGGCTTCTGA AGCAGCCAAT GTCCATGCAA 2160
 CAACATTTGT AACTTTAGGT AACTGGGAT TATGTTGAG TTTAACATTT TGTAACGTG 2220
 TGCTTATAGT TTACAAGTGA GACCCGATAT GTCAATATGC ATACTTATAT TATCTTAAGC 2280
 ATGTGTAATG CTGGATGTGT AAGTACAGT ACTGAAGTTG TAATTTGAAT CTAGTATGGT 2340
 GTTCTGTTTT CAGCTGACTT GGACAACCTG ACTGGCTTTC CACAGGTGTT CCCTGAGTTG 2400
 TTTGCAGGTT TCTGTGTGTG GGGTGGGGTA TGGGGAGGAG AACCTTCATG GTGGCCCA 2460
 TGGCCTGGTT GTCCAAGCTG TGCTCGACA CATCCTCATC CCCAGCATGG GACACCTCAA 2520
 GATGAATAAT AATTCACAAA ATTTCTGTGA AATCAAATCC AGTTTAAAGA GGAGCCACTT 2580
 ATCAAAGAGA TTTTAACAGT AGTAAGAAGG CAAAGAATAA ACATTTGATA TTCAGCAACT 2640
 2641

A
12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 199 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
 20 25 30
 Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
 35 40 45
 Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
 50 55 60
 Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95
 Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
 100 105 110
 Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
 115 120 125
 His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
 130 135 140
 Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
 145 150 155 160
 Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
 165 170 175
 Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
 180 185 190
 Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
 195

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotide
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: Ja
 (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

MGNCTSACNG AYGTNAC

17

A
13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotide
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKUELS: DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: Ja
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

MGNYYDACNG AYGTNAC

17

Patentansprüche

1. Ein Polypeptid
 - a) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen,
 - b) das auf aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen oder dendritischen Zellen vorkommt, und
 - c) das ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht-reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.
2. Ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäure umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.
3. Das Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen gemäß Anspruch 2 und umfassend die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.
4. Eine DNA-Sequenz, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein Fragment hiervon kodiert.
5. DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
 - b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
 - c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen in (a) und (b) hybridisieren.
6. Ein Plasmid oder ein viraler DNA-Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz nach Anspruch 4 oder 5.
7. Eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, stabil transformiert oder transfiziert mit einem Plasmid oder DNA-Vektor nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 7 zur Expression des Polypeptids in der Wirtszelle.
9. Ein Antikörper, der das Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-3 bindet.
10. Ein Antikörper gemäß Anspruch 9, der ein monoklonaler Antikörper ist.
11. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der Ca²⁺-Ionophore Ionomycin aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu einem Antikörper-sekretierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.
12. Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 10 oder 11 erzeugt.
13. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, als Arzneimittel.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
15. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und zur Behandlung einer Dysregulation des Immunsystems.
16. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 als Arzneimittel.
17. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung.

lung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

18. Verwendung von Zellen, enthaltend das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, als Arzneimittel.

19. Verwendung von Zellen nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

20. Verwendung von Substanzen, die das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Moleküle umfassen.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei zur Diagnose eine Hybridisierungs- oder Nukleinsäureamplifikations-technik (z. B. PCR) verwendet wird.

23. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

24. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet wird.

Hierzu 17 Seite(n) Zeichnungen

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning these documents will not correct the image
problems checked, please do not report these problems to
the IFW Image Problem Mailbox.**